

Primjena biokemijskih metoda u forenzici

Uvod

Iznimno brz razvoj različitih biokemijskih i molekularno bioloških metoda potkraj 20. stoljeća omogućio je njihovu primjenu ne samo u znanstvene već i u forenzičke svrhe. Teško je danas i zamisliti rješavanje zločina bez korištenja DNA analize bioloških tragova izuzetih s mjesta zločina ili analize nepoznatih organskih molekula HPLC-MS (engl. *High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) vezanim sustavima. Metode NMR (nuklearna magnetska rezonancija) i IR (infracrvena spektroskopija) osim u laboratorijske, sve se više koriste i u forenzičke svrhe. Imunokemijske metode primjerice ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), koriste se u brojnim testovima primjerice za utvrđivanje tragova droge. Sve ove metode zahvaljujući tehnološkom napretku danas su automatizirane i dovedene do vrlo velike preciznosti i osjetljivosti.

Kako bi se upoznali sa metodama koje se koriste za proučavanje tri osnovne skupine molekula smišljen je „zločin“ koji je u sebi sadržavao elemente svih triju vrsta tragova koje je trebalo obraditi. Cilj projekta bio je riješiti i rekonstruirati zločin na temelju obrađenih dokaza.

Suvremena DNA analiza koja se koristi u forenzičke svrhe vuče svoje podrijetlo iz RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) metode, koja se još uvijek koristi u istraživačke svrhe. HPLC vezani sustavi brza su i jednostavna metoda za detektiranje brojnih organskih uzoraka, a razvijeni su kombinacijom klasičnih tekućinskih kromatografija s spektroskopskim metodama. Proteini, iako ne česti u forenzici, također su uključeni u ovaj projekt preko Western analize.

Materijali i metode

Prvi zadatak bio je odrediti kome od dvaju osumnjičenika pripada trag krvi nađen na mjestu zločina. DNA je izolirana iz krvi metodom koja se temelji na inkubaciji krvi sa 6M gvanidinom uz silikagel te centrifugiranju i ispiranju taloga silikagela koji sadrži DNA u propanolu odnosno etanolu. (Maxim V. Myakishev i sur. *Institute of Gene Biology, 34/5 Vavilov St., Moscow 117334, Russia*). Potom je provedena restrikcijska razgradnja enzimom *XhoI* (sobna temperatura, preko noći). Fragmenti su analizirani elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu uz vizualizaciju etidijevim bromidom.

Nakon toga slijedila je analiza proteinskog uzorka Western analizom. Uzorak proteina prvo je razdvojen pomoću SDS poliakrilamidne gel elektroforeze, nakon čega je sadržaj gela prebačen na membranu. Nakon blokiranja membrane u nemasnom mlijeku u prahu rastopljenom u puferu TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,005% Tween-20 u deH₂O) slijedila je inkubacija membrane u primarnom, a potom i u sekundarnom antitijelu. Proteini su potom vizualizirani na fotografskom filmu.

Organske molekule analizirane su u kontekstu analize sadržaja injekcije kojom je ubodena žrtva. Analiza je uključivala razdvajanja pojedinih komponenata smjese tekućinskom kromatografiji na koloni te detekciju tanskoslojnom kromatografijom. U sklopu predavanja polaznici su naučili osnove tekućinske kromatografije, HPLC-a te HPLC vezanih sustava (MS, NMR, IR). Kroz zadatke savladana je tehnika određivanja struktura kombinacijom MS, IR, te protonskog i ugljikovog NMR-a te su nakon toga polaznici samostalno odredili strukture koje su odvojili tekućinskom kromatografijom iz ranije snimljenih spektara.

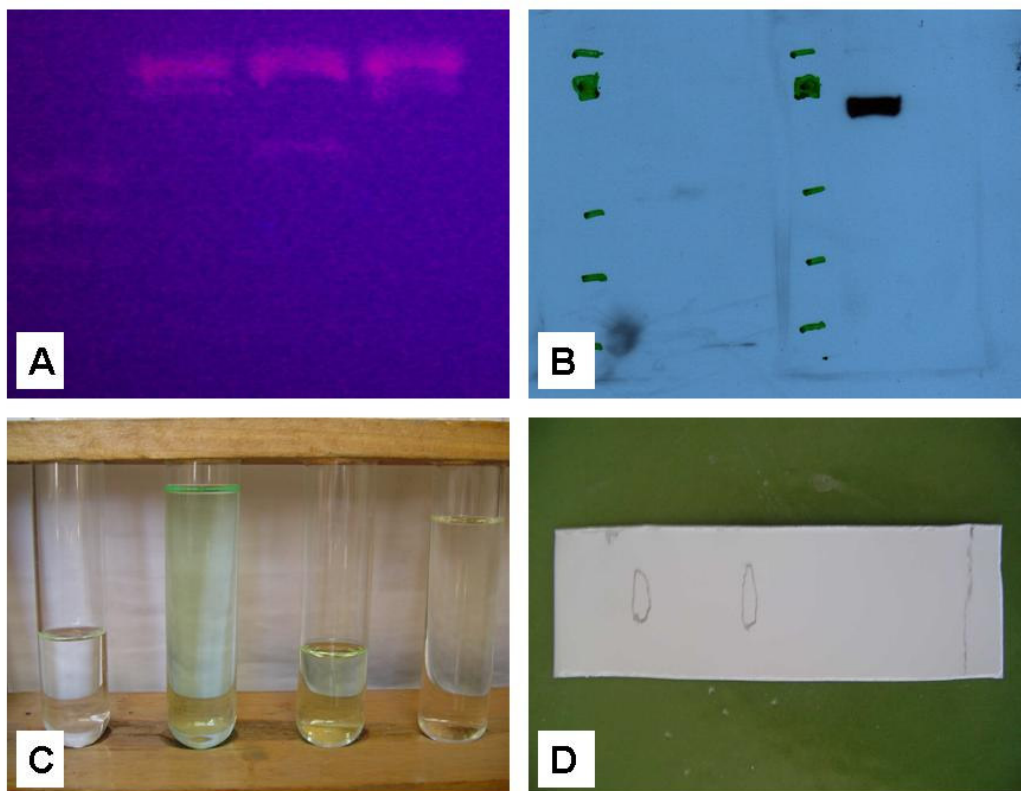
Rezultati i rasprava



Slika 1. Fotografije sa mjesta „zločina“ koje je korišteno kao predložak za projekt

Na mjestu „zločina“ pronađena su 2 trupla, na jednom je pronađen ubod igle (1) te injekcija s ostatkom tekućine u blizini (4). Na ruci žrtve koja je ubodena pronađeni su tragovi krvi (3) te flaster *Emsam* (2). Na drugoj žrtvi pronađeni su tragovi ugriza zmijske (6) i rana na usnici (7). DNA analizom ustanovljeno je da trag krvi s ruke jedne žrtve odgovara krvi druge žrtve što potvrđuje pretpostavku da je došlo do fizičkog obračuna između dvije žrtve prije smrti. Rezultati DNA analize prikazani su na slici 2. Jedna od žrtava preminula je zbog zmijskog ugriza čiji su tragovi jasno vidljivi u predjelu vrata. Poznata je činjenica da su zmijski otrovi mahom proteini stoga su analizirani SDS-PAGE-om uz western analizu. Test je proveden na dva tipa zmijskih otrova, od kojih se pokazalo da jedan odgovara otrovu u

uzorku žrtve. Naposljetku provedena je analiza sadržaja šprice tekućinskom kromatografijom i pomoću spektroskopske strukturne analize utvrđen je sastav otopine koja je izazvala zastoj rada srca jedne od žrtava. Smjesa se sastojala od dvaju tvari: propofola – opći anestetik vrlo brzog djelovanja i efedrina – alkaloida koji se koristi u kapima za nos, ali i kao doping sredstvo. Sam po sebi efedrin nije smrtonosan no u interakciji s MAO inhibitorima (flaster koji je nosila žrtva) dovodi do infarkta.



Slika 2. Rezultati DNA analize (A), rezultati western analize (B) te rezultati tekućinske kromatografije (C) i TLC-a (D).

Zaključak

Procesiranjem tragova izuzetih s mjesta zločina utvrđena je kronologija događaja koja je rezultirala smrću dvaju osoba. Jedna žrtva, nazovimo ju A, napala je onu drugu te joj zadala ubodnu ranu od injekcije u predjelu vrata. Tome u prilog govori kut i mjesto na vratu na kojem je injekcija zabodena, te se isključuje mogućnost samoranjavanja. Budući da se u injekciji uz efedrin koji u kombinaciji s MAO inhibitorima uzrokuje infarkt nalazio i propofol, opći anestetik vrlo brzog djelovanja, osoba B je u vrlo kratkom roku paralizirana. Međutim prije toga osoba B zadala je udarac u području brade osobi A koja je zbog toga pala na pod. Kako se u tom kontekstu našla zmija nije utvrđeno, ali se pretpostavlja da je osoba A u trenutku pada pala na zmiyu, kojih ima jako puno u području gdje se zločin dogodio, dakle smrt osobe A najvjerojatnije je nesretni slučaj.

Literatura

- Prof. dr. sc. Gordan Lauc: Primjena DNA analize u sudskoj medicini, skripta
- Dr. sc. Zdravko Lorković: Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji, skripta
- Dr. sc. Nives Galić: Kromatografija i masena spektrometrija, skripta
- Berg, Tymoczko, Stryer: Biochemistry, fifth edition, Freeman and company, NY, 2002
- Silverstrin, Webster, Kiemle: Spectrometric identification of organic compounds, seventh edition, John Wiley & sons, 2005