

V. KRONIKA

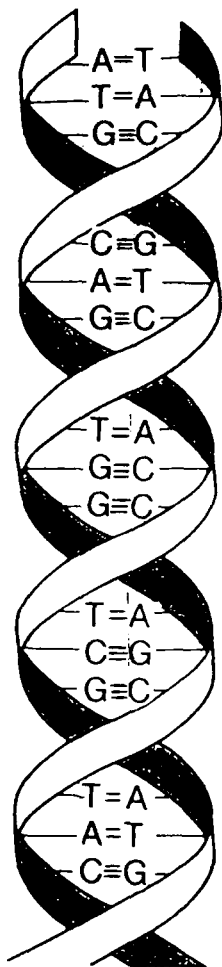
WYKORZYSTANIE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ W BADANIACH NEKROPOLI WCZESNOŚREDNIOWIECZNYCH. PRÓBY UZYSKANIA FRAGMENTÓW INFORMACJI GENETYCZNEJ Z KOŚCI LUDZKICH POCHODZĄCYCH Z XI W.

Metody biologii molekularnej wykorzystywane są dziś bardzo szeroko w wielu dziedzinach wiedzy biologicznej i medycznej. Coraz częściej metody te wykorzystuje się w badaniach systematycznych oraz w diagnostyce niektórych chorób. Założenia, jakimi kierują się badacze, opierają się na fakcie identityczności chemicznej natury składników żywych organizmów, które stanowią początek „łańcucha życia”: kwasów nukleinowych i białek.

Pomiędzy tymi dwiema klasami związków chemicznych istnieją ściśle współzależności. Kwasy dezoksyrybonukleinowy (DNA) i rybonukleinowy (RNA) stanowią nośniki informacji genetycznej, która wyraża się w postaci występowania w każdym żywym organizmie określonych rodzajów białek. Te z kolei warunkują wszystkie funkcje życiowe, wchodząc w skład układów przekształcających energię i materię oraz stanowią podstawowe składniki budulcowe organizmu.

Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się metody oparte na badaniach kwasów nukleinowych. Jak wspomniano powyżej są one nośnikami informacji genetycznej, przekazywanej dziedzicznie. Poza niektórymi wirusami, które swój zapis genetyczny przekazują w postaci RNA, większość organizmów posługuje się DNA jako zbiorem informacji warunkujących cechy organizmu. Poszczególne jej fragmenty stanowią geny, czyli odcinki DNA, na których zapisana jest informacja o jednym białku. Strukturę cząsteczki DNA przedstawia rys. 1. Jak widać cząsteczka DNA składa się z dwóch komplementarnych („pasujących”) względem siebie nici, budowanych z jednostek — nukleotydów. Zasada komplementarności wymuszona jest przez specyficzne oddziaływanie pomiędzy zasadami azotowymi adeniną (A), guaniną (G), cytozyną (C) i tyminą (T). W prawidłowej strukturze DNA możliwe jest oddziaływanie tylko pomiędzy A i T oraz G i C.

Odkrycie mechanizmów replikacji DNA pozwoliło na opracowanie szeregu technik otrzymywania dużych ilości fragmentu informacji genetycznej o zdefiniowanej funkcji. Najważniejszą z nich jest opublikowana w 1988 roku technika zwana *Polymerase Chain Reaction* (PCR), polegająca na użyciu aparatu replikacyjnego bakterii do zwielokrotnienia ilości wybranego fragmentu DNA *in vitro*. Założenia tej techniki są bardzo proste. Znając kolejność nukleotydów danego odcinka DNA można uzyskać krótkie jednoniciowe odcinki komplementarne do początku każdej z nici interesującego ba-



Ryc. 1.

dacza fragmentu DNA. Do mieszaniny, zawierającej powielany odcinek informacji genetycznej dodaje się krótkie odcinki jednoniciowe, i rozbija się strukturę kwasu nukleinowego działaniem wysokiej temperatury. Następnie mieszaninę chłodzi się do temperatury, w której zachodzi ponowne łączenie się poszczególnych nici DNA. Ponieważ krótkie, jednoniciowe fragmenty znajdują się w nadmiarze rzędu $10^8 - 10^{10}$ w porównaniu z powielanym fragmentem, to one zajmują miejsca na początku każdej z nici DNA. Kolejnym etapem jest wydłużenie nici przez polimerazę DNA — białko aparatu replikacyjnego bakterii. Te trzy kolejne etapy stanowią jeden cykl reakcji. Początkiem nowego cyklu jest termiczna denaturacja cząsteczki DNA. Schemat PCR przedstawia rys. 2.

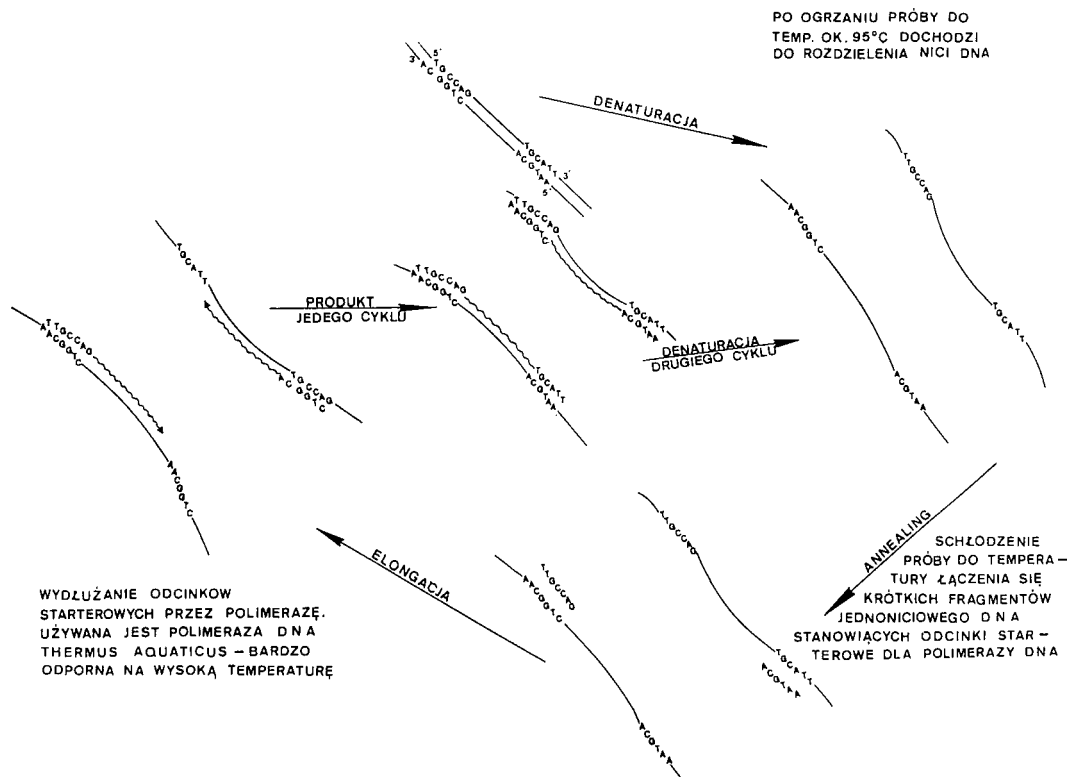
Jak łatwo zauważyć w ciągu jednego cyklu z jednego odcinka DNA powstają dwa siostrzane, w ciągu kolejnego cztery itd. Całkowita ilość powstałego DNA w ciągu N cykli wynosi 2^N .

Ponieważ technika ta pozwala na otrzymanie dowolnego fragmentu DNA w stosunkowo krótkim czasie i w mierzalnej ilości, można ją wykorzystywać przy wszelkiego rodzaju badaniach, polegających na ustalaniu tożsamości osobnika poprzez genetyczne „odciski palców”, bądź do ustalania pokrewieństwa poprzez porównanie fragmentów DNA pochodzących od różnych osobników.

Technika opisana powyżej jest obecnie szeroko wykorzystywana w diagnostyce chorób genetycznych, wirusowych oraz wywołanych przez różnego rodzaju pasożyty. Zastosowania tej techniki obejmują również postępowania dowodowe prowadzone przez pracownie kryminalistyczne. Prowadzi się badania polegające na ustaleniu tożsamości osobnika na podstawie porównania cząsteczek DNA pochodzących z jednego włosa, czy jednego plemnika.

Kilka lat temu podjęto też próby uzyskania informacji genetycznej z fragmentów tkanek uzyskanych z mumii faraonów i zakończono je sukcesem. Fakt ten wskazuje na stosunkowo dużą trwałość cząsteczek DNA nawet po śmierci organizmu. Ostatnio donoszono o uzyskaniu pozytywnego wyniku podobnego eksperymentu prowadzonego na materiale kostnym, pochodzącym sprzed jedenastu tysięcy lat.

Fakt zachowania się DNA w materiale archeologicznym uwarunkowany jest kilkoma czynnikami. Należą do nich przede wszystkim warunki zewnętrzne jakim ulega dany fragment kości, a więc wilgotność gleby i obecność w niej soli mineralnych, zdolnych przenikać przez pory kości. Nie bez znaczenia są też warunki przechowywania uzyskanego materiału kostnego.



Ryc. 2.

W Zakładzie Biochemii Biopolimerów UAM w Poznaniu przeprowadzono eksperyment, przedmiotem którego było DNA kości ludzkich pochodzących z wczesnośredniowiecznego cmentarzyska w Dziekanowicach stan. 22. Celem badań było ustalenie procedury izolacji i amplifikacji DNA metodą PCR z wymienionego materiału. Podczas próby wykorzystano materiał kostny o masie ok. 200 – 300 mg. Z tej ilości udało się wyeluować taką ilość DNA ludzkiego, iż mogła ona stanowić matrycę reakcji PCR.

Czułość metody PCR pozwoliła na uzyskanie dostatecznej ilości produktu, aby można było użyć go jako matrycy do reakcji sekwencjonowania. Selektywność tej metody pozwala na amplifikacje DNA o wiadomym pochodzeniu przy jednoczesnym wykluczeniu możliwości otrzymania produktu amplifikacji w postaci genów grzybowych czy bakteryjnych. Technika ta umożliwia również użycie jako matrycy DNA zanieczyszczonego, jeśli tylko na zanieczyszczenia nie składają się inhibitory polimerazy DNA z *Thermus aquaticus*.

Wynik eksperymentu pozwala przypuszczać, iż w materiale kostnym znajduje się ilość DNA wystarczająca do przeprowadzenia amplifikacji metodą PCR. Wykorzystanie tej metody jest ograniczone dwoma czynnikami: wiedzą na temat ludzkiej informacji genetycznej i wyobraźnią badaczy. Pozwala ona na wykazanie pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi osobnikami i pomiędzy grupami osobników, czy też umożliwia badanie chorób genetycznych w obrębie danej populacji.

Andrzej Rezler, Jacek Wrześniński