

HVEM HAR ETTERLATT DNA?

Hensikt

Hensikten med forsøket er å utvikle en grunnleggende forståelse for DNA fingeravtrykksanalyser basert på restriksjonsenzymer og deres bruk i rettsmedisinske undersøkelser.

Bakgrunn

DNA fingeravtrykksanalyser (DNA-profilering) er mye brukt i kriminalsaker som en meget sikker metode for å identifisere kilden til DNA-spor på et åsted. Metoden baserer seg på sammenligning av DNA-profilen til det biologiske sporet fra åstedet med profilene til ulike mistenkte personer. I dag benyttes PCR-teknikken til å generere DNA-profiler, men opprinnelig benyttet man restriksjonsenzymer for å utarbeide genetiske fingeravtrykk. Alle individer har små variasjoner i DNA-sekvensen som resulterer i DNA-fragmenter av ulike størrelser når isolert DNA behandles med restriksjonsenzymer. Prøvene analyseres ved elektroforese, og det resulterende fragmenteringsmønsteret representerer personenes individuelle, genetiske fingeravtrykk. Denne metoden kalles restriction fragment length polymorphism (RFLP)-analyse.

I dette forsøket brukes RFLP-prinsippet til å analysere DNA (simulert av fargestoffer) fra et hypotetisk åsted for en kriminell handling og fra to mistenkte personer. Oppgaven er å separere DNA-fragmentene (som allerede er kuttet med restriksjonsenzymer) ved agarosegelelektroforese og deretter sammenlikne mønstrene (de genetiske fingeravtrykkene) for å identifisere gjerningspersonen for den kriminelle handlingen.

Aktuelle læringsmål

Biologi 2, bioteknologi. Gjør greie for fremstilling av genetiske fingeravtrykk, og hvordan de kan brukes i rettsmedisin og i studier av slektskap mellom individer og grupper av organismer.



LÆRERNOTATER

Utstyr

Medfølgende innhold: Ferdig alikvoterte fargestoffer klare til elektroforese, practice gel loading solution, agarose, konsentrert elektroforesebuffer (50 x TAE), engangspipetter (plast). Forsøkssettet inneholder materialer til 10 elevgrupper.

Oppbevaring: Alle komponenter oppbevares i romtemperatur.

Nødvendig tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Elektroforesekar (5441.50/5441.60/5441.65), spenningskilde (5441.22/5441.24), vekt (1028.90), erlenmeyerkolbe 250 ml (0079.10), målesylindre (0118.20, 0118.21, 0118.24)/pipettefyller og pipetter (0153.30, 0140.84), mikrobølgeovn/kokeplate (0668.10), destillert vann (8903.00-6).

Anbefalt tilleggsutstyr (foreslåtte varenumre i parentes): Hansker (0860.46-49), mikropipetter (0144.06/0134.06) og pipettespisser (0134.06), mikrosentrifuge (0677.00), visualiseringsutstyr (5444.20).

Forberedelser

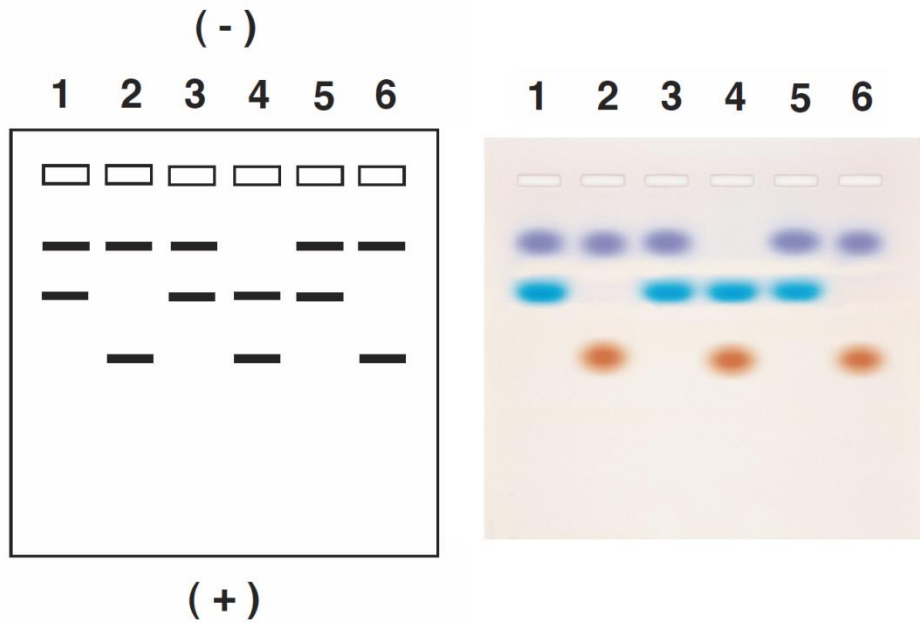
Agarosegelene kan støpes på forhånd for å korte ned forsøks tiden. Ferdigstøpte geler kan forsegles med plastfolie og oppbevares i kjøleskap i inntil 1-2 uker. Elektroforese-buffere (TAE) og FlashBlue-fargeløsningen kan også fortynnes på forhånd.

Forsøkstid

Ca. 45 minutter

Resultatanalyse – fasit

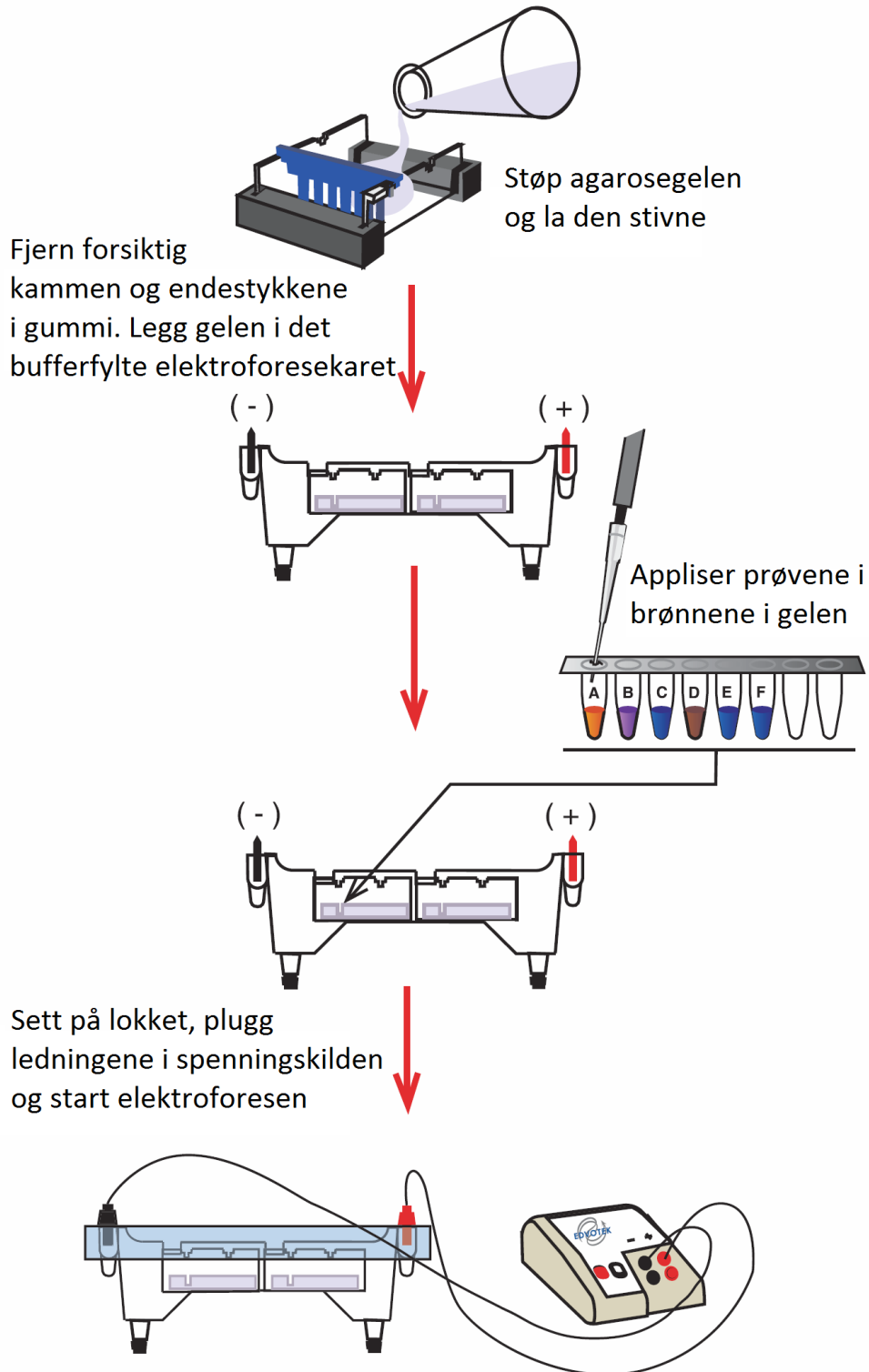
1. Se skjematisk fremstilling og bilde av forventede resultater i Figur 1 på neste side. DNA-profilen til mistenkt 2 matcher DNA-profilen fra DNAet funnet på åstedet. Det er derfor sannsynlig at det er mistenkt 2 som har begått den kriminelle handlingen.
2. De forskjellige, fargete båndene representerer DNA-fragmenter av ulik størrelse som er generert ved å kutte DNA isolert fra åstedet og de to mistenkte med to ulike restriksjons-enzymmer (i separate reaksjoner).
3. Individuelle variasjoner i DNA-sekvensen hos ulike personer gir ulike DNA-fragmentmønstre når DNA-prøvene behandles med restriksjonsenzymmer. De resulterende DNA-profilene blir derfor forskjellige.
4. Eneggede tvillinger har identiske DNA-profiler siden de har lik DNA-sekvens.



Figur 1. Skjematisk fremstilling (venstre) og bilde (høyre) av fargestoffenes relative plasseringer i agarosegelen etter elektroforese. Brønn 1: DNA-prøve 1 fra åstedet, brønn 2: DNA-prøve 2 fra åstedet, brønn 3: DNA-prøve 1 fra mistenkt 1, brønn 4: DNA-prøve 2 fra mistenkt 1, brønn 5: DNA-prøve 1 fra mistenkt 2, brønn 6: DNA-prøve 2 fra mistenkt 2.

ELEVVEILEDNING

Flytskiema – oversikt over forsøket



Utførelse

Laboratoriesikkerhet

Bruk hansker og vask hendene godt med såpe og vann etter å ha jobbet i laboratoriet.

Støping av 0,8 % agarosegeler

1. Sett et gelkar i støpekammeret eller forsegl karet med endestykker/tape og sett i en kam med 6 tenner (se flytskjemaet). Vei inn 0,39 g agarose og overfør til en 250 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 1,0 ml 50x konsentrert TAE-buffer og 49,0 ml destillert (deionisert/demineralisert) vann (eller 50 ml 1x TAE-buffer). Dette er nok til 1 stk 0,8 % agarosegel.
2. Kok opp i mikrobølgeovn (høy effekt i ca 1 min). Kok opp gjentatte ganger (høy effekt i ca 25 s) til agarosen er fullstendig oppløst og løsningen er klar som vann. Roter kolben innimellom for å få en jevn agaroseløsning. Følg nøye med for å unngå at det koker over. Sjekk at det ikke er uløst agarose eller klumper i løsningen.
3. Avkjøl agaroseløsningen under rennende vann mens du roterer kolben til temperaturen er ca 60 °C (når du kan holde kolben i hånden uten å brenne deg). Sett gelkaret på et horisontalt underlag og hell i agaroseløsningen. La stå til gelen har stivnet (20-30 min).

Applisering av prøvene på gelen

1. Fjern endestykkene/tapen på gelkaret og legg gelen i elektroforesekaret slik at brønnene er nærmest den negative (svarte) elektroden (se flytskjemaet). Hell 1x TAE-buffer i karet til buffernivået er omtrent 5 mm over gelen. Ta kammen forsiktig ut av gelen. Se til at det er buffer i alle brønnene.
2. Sentrifuger prøvene kort eller dunk dem lett mot bordplaten for å samle hele volumet nederst i røret. Appliser 35 µl av prøvene A-F i brønnene 1-6 på gelen i rekkefølge, fra venstre mot høyre (se flytskjemaet og Tabell 1 under). Husk å bytte pipettespiss mellom hver prøve. Pass på at du ikke stikker pipettespissen for langt ned slik at det blir hull i brønnen. Tips: dersom brønnene er vanskelige å se kan det hjelpe å legge et svart/mørkt papirark e. l. under elektroforesekaret.

Tabell 1. Skjema for applisering av DNA-prøvene på gelen.

Brønn	Prøve	Beskrivelse
1	A	DNA fra åstedet 1
2	B	DNA fra åstedet 2
3	C	DNA-prøve 1 fra mistenkt 1
4	D	DNA-prøve 2 fra mistenkt 1
5	E	DNA-prøve 1 fra mistenkt 2
6	F	DNA-prøve 2 fra mistenkt 2

Elektroforese

1. Sett lokket på elektroforesekaret og koble til spenningskilden. Kjør gelen på 70-125 V i 30-60 min (se flytskjemaet). Tiden det tar å separere DNA-molekylene avhenger av spenningen og størrelsen på elektroforeseapparatet. Se Tabell 2 under for anbefalte innstillinger av elektroforeseapparatene fra Edvotek. Ikke sett spenningen høyere enn anbefalt da for høy spenning kan resultere i at gelen smelter. Når elektroforesen er i gang dannes små, synlige bobler på elektrodene, og de negativt ladete DNA-molekylene vandrer mot den positive elektroden. La fargestoffene migrere 3-4 cm vekk fra brønnene.
2. Når elektroforesen er ferdig, skrus strømmen av før lokket fjernes.

Tabell 2. Anbefalte innstillinger for Edvoteks elektroforeseapparater. Tids- og spenningsangivelsene kan også brukes som retningslinjer for elektroforeseapparater av de fleste andre merker. Gjengitt med tillatelse fra Edvotek.

Tid og spenning		
Volt	M6Plus Minimum/maksimum	M12 og M36 Minimum/maksimum
150	15/20 min	25/35 min
125	20/30 min	35/45 min
70	35/45 min	60/90 min
50	50/80 min	95/130 min

Visualisering av DNA

1. Legg gelen i en gjennomsiktig plastpose (f. eks. en ziplock-pose eller brødpose). Legg gelen på en lyskilde med hvitt lys for tydelig visualisering av DNA-båndene. Resultatet kan dokumenteres ved å ta bilde av gelen med et digitalkamera.

Avfallshåndtering

Geler og plastavfall kan kastes i restavfallet. Elektroforesebufferen (1x TAE-buffer) kan helles ut i vasken. Skyll godt med vann etterpå.

Resultatanalyse

5. Sammenlign DNA-profilene (de genetiske fingeravtrykkene) til de to mistenkte personene (mistenkt 1: brønn 3 og 4, mistenkt 2: brønn 5 og 6) med profilen til DNAet fra åstedet (brønn 1 og 2), og identifiser gjerningsmannen for den kriminelle handlingen på bakgrunn av dette.
6. Hva representerer de ulike fargede båndene som ble separert ved elektroforese?
7. Hva er det som gjør at alle individer har ulike DNA-profiler?
8. I hvilke tilfeller har to personer identiske DNA-profiler?