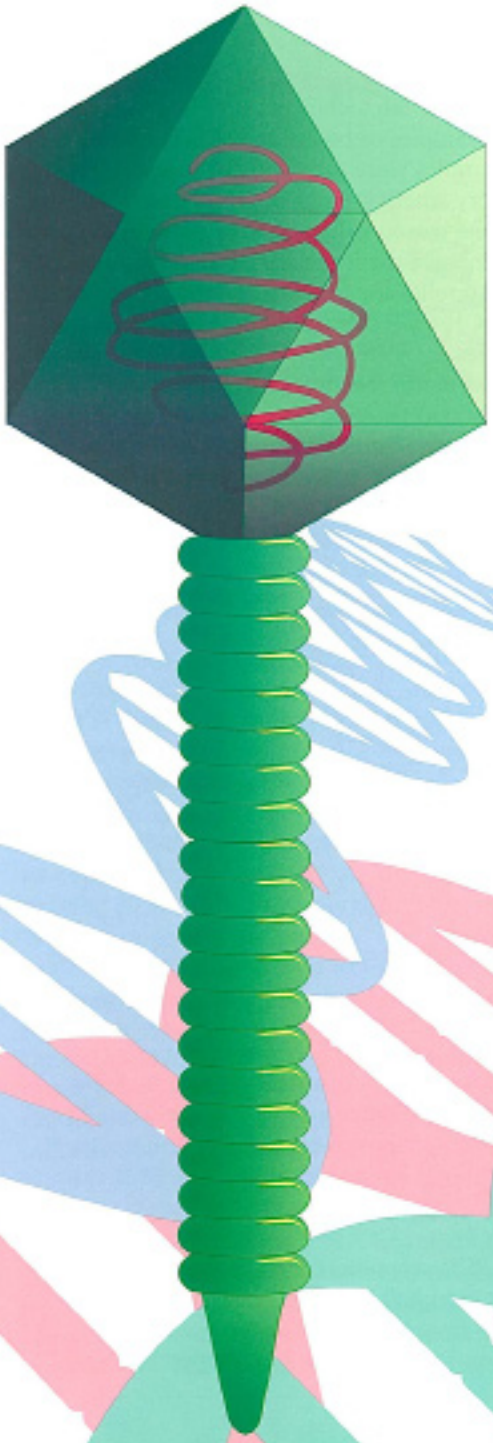
UTFORSK

Elektroforese og kriminalsaker

STUDENVEILEDNING



ROOM TEMPERATURE Storage DNA

CAROLINA

FYBIKON AS

BAKGRUNN

Introduksjon
Alle personer har en unik DNA-profil. Analyse av DNA-profiler er derfor et svært viktig verktøy for å identifisere personer i etterforskning av kriminalsaker, ved store ulykker, i immigrasjonssaker og i farskapssaker. Prosessen kalles DNA-fingeravtrykkmetode og kan med 100 % sikkerhet identifisere et individ ved å analysere peronens genetiske kode. Mennesker og sjimpanser har 98% identiskt DNA. Du kan derfor tenke deg hvor liten del av to menneskers DNA som er ulik. Heldigvis er det områder i DNA molekylet hvor ulikhetene mellom mennesker er konsentrert. Ved å analysere disse områdene kan kriminaletterforskere rekonstruere en persons DNA fingeravtrykk.

På et åsted finner man gjerne små biologiske spor som blod, sæd, hår, spytt, bein og hud. Fra dette materialet kan vi isolere DNA selv fra ørsmå spor fordi vi i prinsippet kan kopiere opp DNA-et fra en enkeltcelle. Et ørlite biologisk spor på åstedet kan derfor være nok til å finne skyldige i en kriminalsak. DNA-profilen man får fra sporet på åstedet kan sammenlignes med DNA-profiler fra mistenkte eller DNA-profiler i et DNA-register. I denne øvelsen skal du identifisere en fiktiv morder ved å sammenligne den mistenktes DNA med DNA funnet på åstedet. Du skal gjøre dette ved å benytte de samme metodene som kriminaletterforskere.

Kriminalsaken
Jim og hans kjæreste Sara har vært på nattkino i byen. De kjører bil og på hjemveien stopper de for å ta ut penger i en minibank som ligger øde til på en parkeringsplass. Sara sitter i bilen mens Jim går mot minibanken. I det han har slått inn PIN koden og beløpet, og transaksjonen starter, dukker det opp en maskert mann fra buskene som ligger bak minibanken. Han har hansker på, og med en hard gjenstand slår han mot Jim. Sara som sitter i bilen forsøker så raskt hun greier å finne frem mobilen å slå nummeret til politiet. Samtidig ser hun at Jim blir brutalt banket av gjerningsmannen. Etter å ha banket Jim fra sans og samling tar mannen tak i pengene som stikker ut fra minibanken og løper avgårde. Mens han løper drar han av seg masken og Sara greier så vidt å se ansiktsprofilen mot lyset fra billysene. Politi og ambulase kommer noen få minutter etterpå.

Figur 1: Angrepet

Jim blir fraktet til sykehuset hvor han i løpet av noen timer dør av skadene han fikk fra slagene. Sara blir i etterkant tatt med til politistasjonen hvor hun greier å finne to personer i politiets kriminalregisteret som hun synes ligner gjerningsmannen. Politiet greide raskt å oppspore de to mistenkte og sette dem i varetekt, men begge har imidlertid alibi for tidspunktet.
Da Sara ser de mistenkte i varetekt ser hun at den ene av de mistenkte har kloremerke i ansiktet og forteller politiet hvordan Jim klorte gjerningsmannen under angrepet. Den mistenkte hevder imidlertid at han fikk skrammen mens han jobbet med bilen sin. Politiet sender kriminaletterforskere opp til sykehuset hvor de greier å fjerne blod og hud som de finner under Jims fingernegl. Dette skal fungere som bevismateriale.

Laboratoriet
Laboratorietekniker den natten var Maria. Hun mottok blod- og hudprøver som bevismateriale. Det var lite materiale, men Maria håpet likevel at hun skulle greie å få noen resultater ut av DNA-prøvene. Hun fant frem det nødvendige utstyret til å foreta en PCR (polymerase kjede reaksjon) av DNA prøvene. En PCR reaksjon kan kopiere DNA selv fra små prøver.

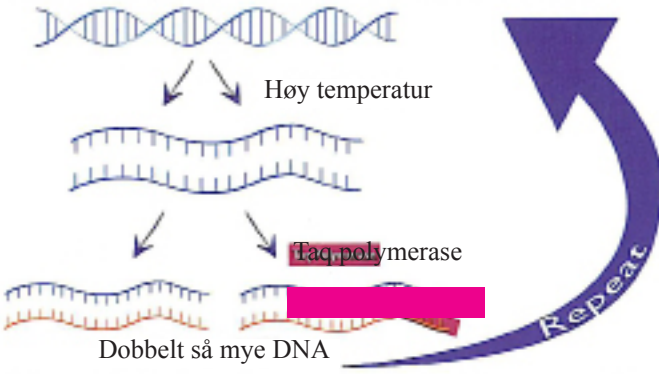
PCR er viktig for to grunner: for det første vil det sørge for å gi nok materiale å jobbe videre med (man lager mange kopier). I dette tilfelle var det helt nødvendig siden det kun fantes en liten mengde bevismateriale. For det andre, vil PCR metoden selektivt velge ut kun de delene av DNA som Maria ønsker å undersøke videre.

Et vanlig problem ved å bruke DNA til person-identifisering er at DNA mellom hvilke som helst to mennesker er omtrent 100% identisk. Derfor er det nødvendig å finne frem til de delene i DNA som varierer mest mellom to individer. PCR hjelper til med denne prosessen siden den selektivt (vha primere) velger ut og kopiere kun små DNA sekvenser (Figur 2).

Figur 2: Ved PCR metoden kan du se på kun de DNA områdene hvor det er mest sannsynlig å finne forskjeller mellom to individer

Maria utførte PCR for de ulike DNA prøvene. Både DNA fra bevismaterialet og fra de to mistenkte ble kopiert ved PCR reaksjon. I tillegg ble det utført PCR fra Jims eget DNA slik at Maria kunne være sikker på at DNA som ble brukt som bevis ikke hadde blitt blandet med Jims.

Maria utførte PCR reaksjonene ved å benytte et enzym som kalles *Taq polymerase* (Figur 3). Polymerase enzymer kopierer DNA. Taq polymerase blir isolert fra en type bakterier som vokser i varme kilder ved temperaturer opp mot kokepunktet. Dette enzymet er stabilt nok til å tåle effekten av de ekstreme temperaturforandringene man blir nødt til å gjøre for å få DNA kopiert. Den doble DNA-tråden denatureres og splittes i to enkelttråder ved temperaturer omkring 93-98°C. Polymerase enzymene kopiere kun enkelttrådet DNA, og derfor blir DNA varmet opp til disse temperaturene. Polymerase enzymet kopierer så sekvensen (normalt ved 72 °C).



Figur 3: PCR kan lage mange kopier av DNA slik at fra en liten mengde DNA kan man utvinne relativt store mengder.

Deretter denatureres DNA igjen før det kopieres. Prosessen gjentas ca. 30 ganger for å få ønsket mengde DNA. Kopieringen av DNA ved PCR skjer eksponentielt. Fra hver DNA tråd oppstår det to kopier, som i sin tur gir opphav til to nye kopier, og så videre. På denne måten vil hun doble mengden DNA 340 ganger, som gir 2^{340} ganger så mye DNA som hun startet med. Forhåpentligvis vil disse kopiene være nok for laboratoriet å bestemme om noen av de mistenkte virkelig er Jims morder.

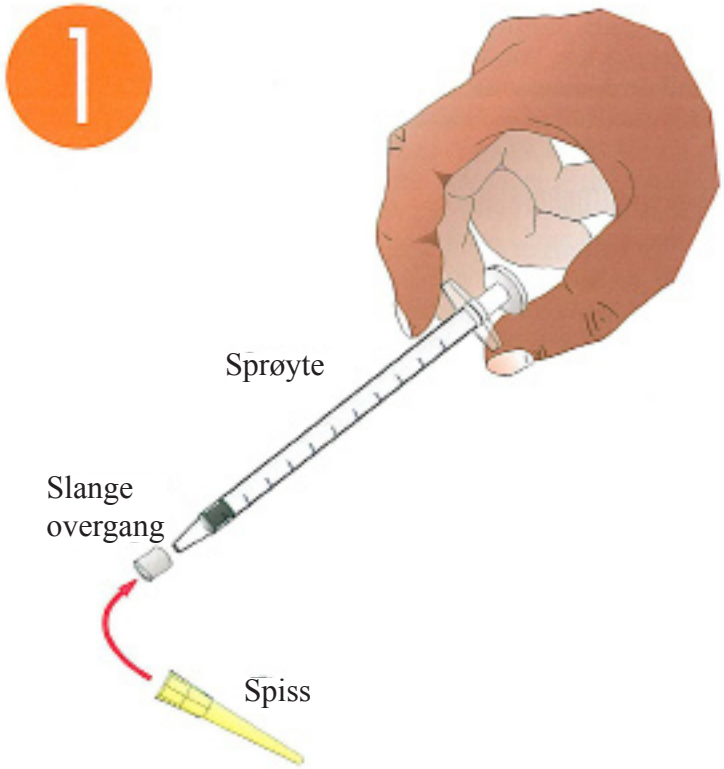
Marias nattskift er over idet PRC reaksjonene er ferdige. Det er nå du kommer inn og overtar som labtekniker. Du skal ta over der hvor Maria avsluttet, og være med på å vurdere om DNA beviset kan knyttes til en av de mistenkte....

Gelelektroforese

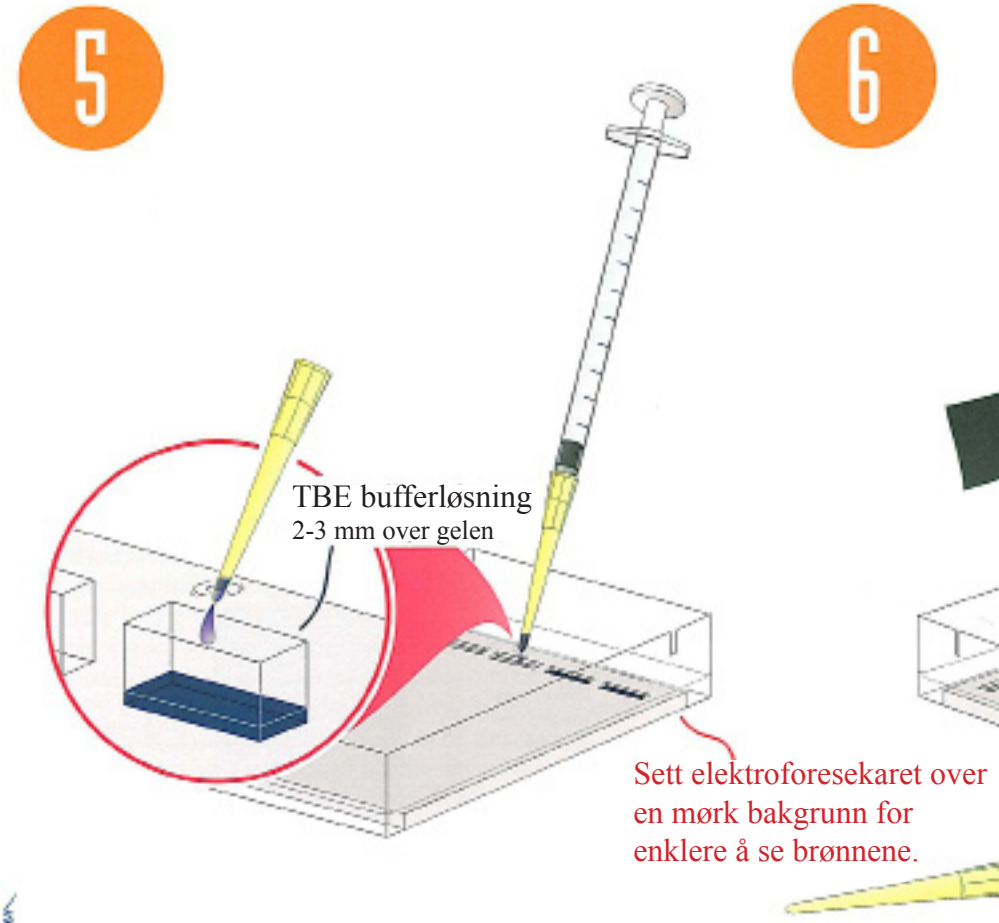
Prinsippet for gelelektroforese er å skille DNA-sekvenser fra hverandre på grunnlag av deres størrelse. Ved gelelektroforese av DNA kan vi bruke en gel som er laget av agarose (som utvinnes fra alger i havet). I gelen er det porer som DNA-sekvensene vandrer gjennom når det settes strøm på gelen. DNA er negativt ladet (DNA inneholder negativt ladede fosfatgrupper) så det vil vandre fra negativ til positiv pol i gelen. Porene er en hindring for store DNA-sekvensene slik at DNA vandrer gjennom gelen med ulik hastighet avhengig av hvor stort det er. En forutsetning for at DNA-sekvensene skal kunne vandre i gelen er at det må være til stede en strømleder. Derfor helles det en buffer over gelen. Bufferen inneholder ioner som leder strøm under elektroforesen.

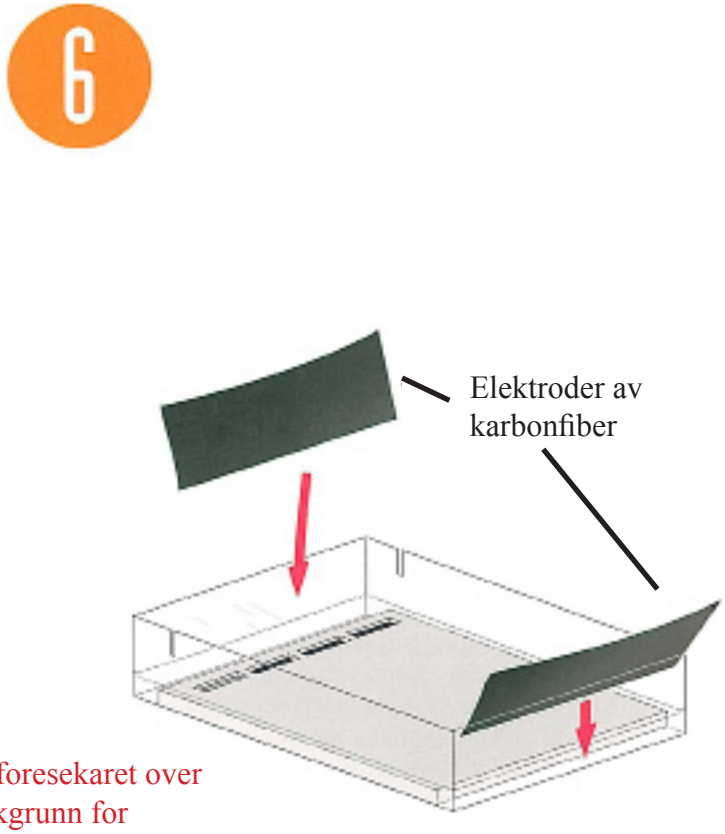
I gelen plasserer man DNA prøvene i brønner. Prøvene er da blandet med et fargestoff (NB! selve DNA´et farges ikke) som hjelper deg å se progresjonen under elektroforesen. Fargen i prøvene oppfører seg som de korteste DNA-sekvensene og vil derfor vandre raskest i gelen. Du skal stoppe elektroforesen når du ser fargestoffene nærme seg den positive siden.

Når gelelektroforesen er ferdig, farges gelen med et fargestoff som binder seg til DNA slik at DNA-sekvensene blir synlige og danner et mønster (DNA-fingeravtrykk). Du vil da kunne sammenligne DNA-fingeravtrykket fra de to mistenkte og offeret mot fingeravtrykket fra DNA beviset, og slik løse saken.


1
Sprøyte
Slange
overgang
Spiss

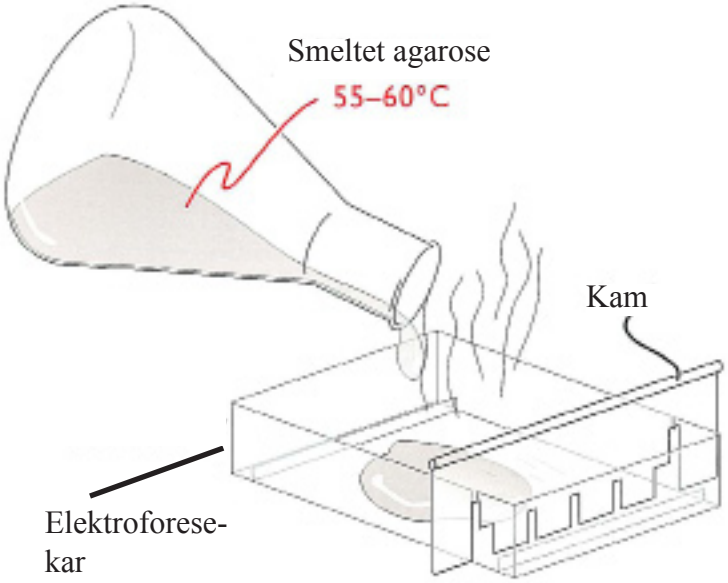
2
Elektroder av
karbonfiber
42 mm
22 mm


5
TBE bufferløsning
2-3 mm over gelen
Sett elektroforesekaret over
en mørk bakgrunn for
enklere å se brønnene.

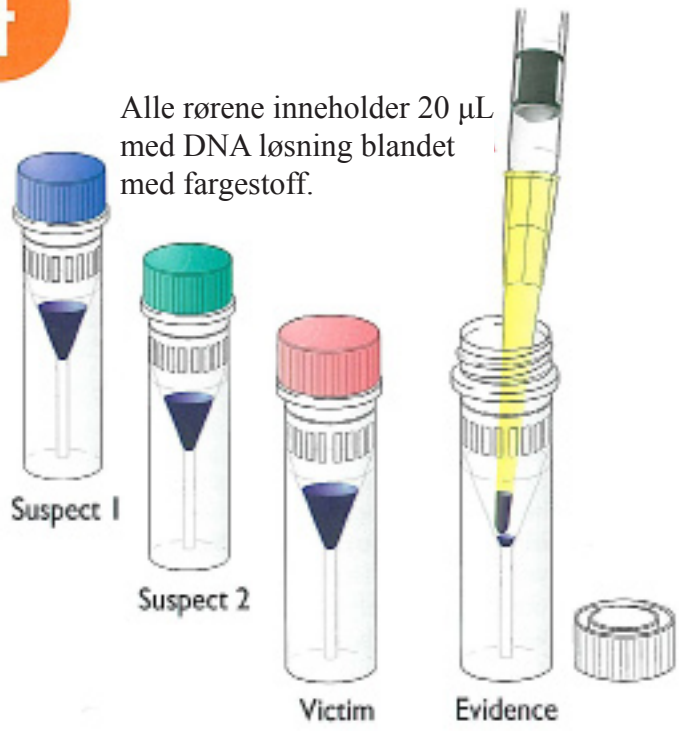

6
Elektroder av
karbonfiber

Dean Madden

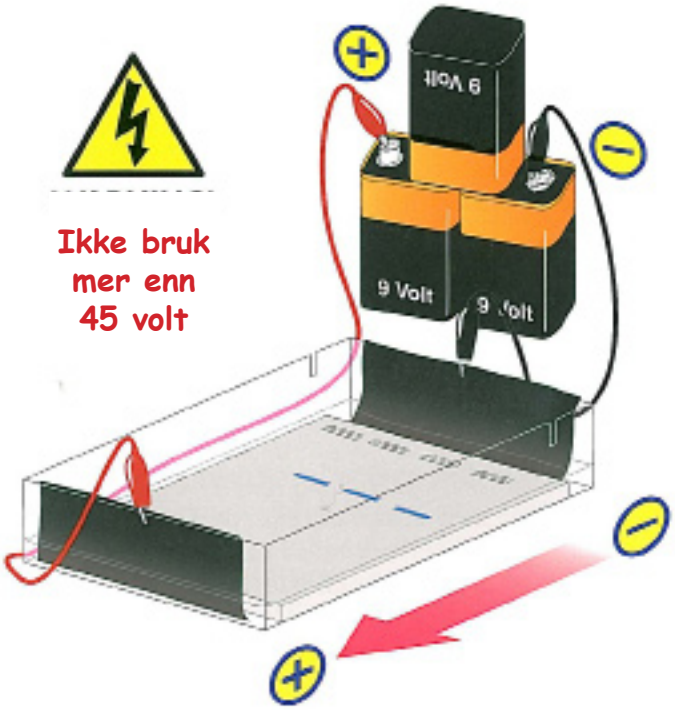
3


Smeltet agarose
55–60°C
Kam
Elektroforese-
kar

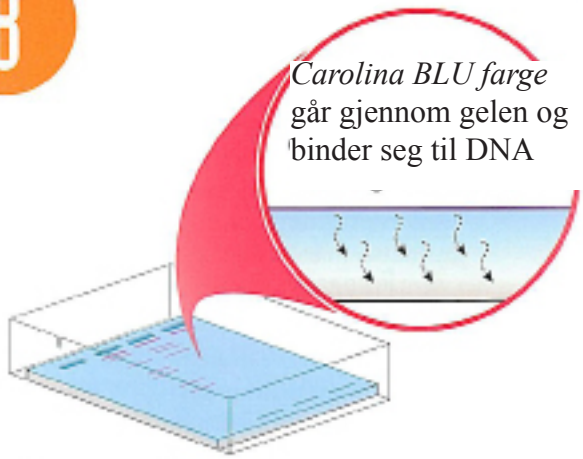
4

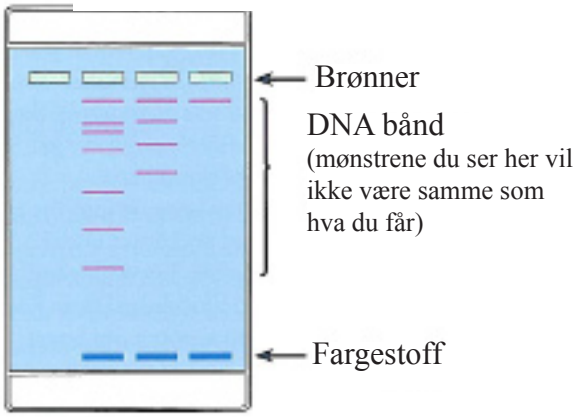

Alle rørene inneholder 20 µL
med DNA løsning blandet
med fargestoff.
Suspect 1
Suspect 2
Victim
Evidence

7


Ikke bruk
mer enn
45 volt
9 Volt
9 Volt
9 Volt

8


Carolina BLU farge
går gjennom gelen og
binder seg til DNA


Brønner
DNA bånd
(mønstrene du ser her vil
ikke være samme som
hva du får)
Fargestoff

1 Hvordan bruke sprøytepipetten

Sprøyten på 1 ml som følger med i dette settet skal passe til de gule spissene når man benytter en slagebit som overgang mellom sprøyten og spissen. Det kan være lurt å øve seg med noen testprøver før de vikrelige prøvene benyttes.

- Plasser overgangen (en liten slangebit) i enden av sprøyten.
- Sett på spissen. Pass på at alle delene sitter godt festet til hverandre.
- Før du fyller sprøyten skal du dra ut stempelet litt (1-2 mm), slik at du får litt ekstra luft inn som hjelper til å få ut den siste dråpen.
- Når du skal avsette væskeprøven bør du holde mikrolitersprøyten i vertikal posisjon, og samtidig være plassert slik at du ser godt hva du gjør.
- Forsøk å ikke vær nær spissen med fingrene dine. Det er DNA i svetten din som kan forurense og bryte ned prøvene.

2 Lag elektroder

Klipp to biter av karbonfibertøyet, hver på omlag 42 x 22 mm. Dette skal være elektrodene på hver side av elektroforesekaret. Legg dem til side til etter du har fylt karet med agarosegel.

3 Klargjør agarosegelen

- Bruk en mikrobølgeovn, varmeplate eller vannbad for å smelte agarosegelen (0,8% i TBE buffer). Rør undervies dersom du varmer opp på plate, eller vannbad. Det skal ikke være klumper i den smeltede agarosen. Oppbevar den på vannbad ved 55-60 °C til du trenger den.
- Plasser elektroforesekaret på et jevnt underlag. Sett ned kammen i den ene enden av karet.
- Hell omlag 10 ml smeltet agarose i midten av elektroforesekaret slik at hele fordypningen i midten er dekket. Forsøk å ikke søl agarose i endene av karet (dersom du søler la det stivne før du fjerner det).
- La karet stå uforstyrret i 20-30 minutter til agarosen har stivnet.

4 DNA prøvene

Hvert prøveglass inneholder 20 µL med løsning. Løsningen inneholder DNA med en buffer (EDTA) for stabilitet, samt en blå farge (bromfenolblått), og sukrose.

NB!

- DNA-materialet i dette settet er stabilisert for oppbevaring ved romtemperatur (20 °C). Ikke oppbevar det i direkte sollys. Dersom materialet oppbevares over lengre tid kan vann fordampe fra DNA løsningen. Dette vil ikke ødelegge DNA, men redusere løsningens volum og viskositet. Derfor anbefaler vi at DNA oppbevares ved 4 °C dersom materialet skal oppbevares over 6 uker. Dersom du synes prøvene dine virker viskøse kan du tilsette 10-15 µL med destillert vann rett før bruk.
- Dersom DNA løsningen er spredd inne i røret (f.eks at det ligger noe i topplokket), bank røret met en hard overflate for å samle alt til bunnen av røret. Eventuelt kan du bruke en sentrifuge.

5 Klargjør og fyll brønnene med prøver

- Hell omlag 10-12 ml med TBE buffer løsning opp i elektroforesekaret. Væsken skal akkurat dekke over gelen og samtidig fylles i områdene hvor elektrodene er.
- Løs forsiktig kammen fra elektroforesekaret slik at bufferløsningen fylles i brønnene. Når du gjør dette er det viktig å være forsiktig slik at brønnene ikke ødelegges.
- Plasser elektroforesekaret på en jevn overflate hvor det kan stå uforstyrret mens elektroforesen utføres.

NB! Det kan være lurt å plassere karet på en mørk bakgrunn for lettere å se hva du gjør videre nå.

- Fest en ren gul spiss til sprøyten og sug opp all DNA-løsningen fra et av testrørene i spissen.
- Pipetter ut løsningen i en av brønnene. Hold spissen over brønnen, men under bufferløsningen (se illustrasjon). Vær forsiktig slik at du ikke stikker hull i brønnen med spissen.

- Noter deg hvilken DNA-prøve du har plassert i hvilken brønn (plasser et papirark i front som du notere på, eller skriv direkte på boksen med en penn som kan vaskes bort).
- Repeter punktene ovenfor med resten av prøvene. Husk å bytt til en ny spiss for hver nye prøve.

6 Plasser elektroder oppi karet

- Plasser de to elektrodene i hver sin ende av karet, slik illustrasjonen viser (pass på å ikke beveg karet mens du gjør dette).
- Sjekk at det er kontakt mellom elektrodene og bufferløsningen, og at også geloverflaten er dekket av TBE bufferen (se tegning under). *Dersom mye av bufferløsningen suges inn i elektrodene kan det være du må tilsette litt mer bufferløsning, men tilsett da så lite som mulig ettersom elektroforesen tar lengre tid å kjøre dersom det er mye buffer.*

Kjør gelelektroforese

- Koble batteriene til elektrodene vha krokodilleklemmene. Batteriene (koblet i serie) skal totalt aldri gi mer enn 45 volt. Se etter at den positive enden på batteriet er koblet til elektroden som er lengst fra brønnene.

Antall 9-volt batterier	Varighet for elektroforesen	Antall elektroforeser fra ett sett nye batterier*
1	12 timer (over natten)	1
2	4-5 timer	2
3	3,5 timer	2
5	1 time	1

* *Duracell alkaliebatteri*

Dersom man kobler utstyret til en strømkilde kan det resultere i alvorlig eller dødelig elektrisk sjokk.

- La elektroforesen kjøre uforstyrret. Dersom utstyret er i et varmt rom bør man sette hele karet i en plastikkpose for å redusere fordampning.
- Batteriene frakobles idet fargestoffene har vandret til den andre siden.
- Vaks og tørk krokodilleklemmene godt for å hidre korrosjon.

NB!

- Ioner i TBE bufferløsningen leder elektrisitet. Denne bufferen er basisk, og da vil fosfatgruppene i DNA være negativt ladet, og derfor bevege seg mot den positive elektroden (anoden) når det settes på strøm. EDTA i bufferen chelaterer (binder) toverdige kationer. Dette hindrer at DNA ødeleggES ettersom slike ioner er nødvendige (som kofaktorer) for enzymer som bryter ned DNA.
- Fargestoffet i DNA prøvene inneholder bromfenolblått. Dette fargestoffet reagerer ikke med DNA, men vandrer gjennom gelen (litt raskere enn de minste DNA sekvensene). Sukker i fargeblandingen sørger for at både DNA og bromfenolblått synker til bunns i brønnen.
- Ved å benytte høy spenning vil DNA sekvensene vandre raskere gjennom gelen, men DNA båndene vil ikke separeres og bli like tydelige.

DNA staining (farging)

- Fjern elektrodene og hell av bufferløsningen (bufferen kan benyttes flere ganger, men ikke i det uendelige).
- Ta på deg engangshansker slik at du ikke får fargestoffet på huden din.
- Hell omlag 10 ml av DNA-staining løsningen (*Carolina BLU consentrate*) over geloverflaten.
- Lå det stå i ro i nøyaktig 4 minutter før du da heller løsningen over i en flaske (*Denne kan benyttes flere ganger, men etter flere gjenbruk kan det være den må sitte lengre enn 4 minutter).*
- Vask geloverflaten forsiktig med kaldt vann. Gjennta vaskingen 3-4 ganger for å fjerne alle rester. Bruk helst destillert eller ionisert vann ettersom dette vil bevare DNA båndene lengre.
- Putt elektroforesekaret i en plastpose, slik at gelen ikke tørker ut, og la den utvikle seg til neste dag.
- Neste dag, bør du avfarge gelen igjen. Denne gangen ved å la "vaskevannet" bli værende i karet og skiftet det omtrent 4 ganger (en gang hver 2. time). Dette vil gradvis vaske bort all "bakgrunns" farge.

Resultater og analyse

- Plasser elektroforesekaret på en hvit bakgrunn slik at fargede DNA-bånd kommer bedre til syne.
- Sammenlign bevis DNA med DNA fra de to mistenkte. Hvilken mistenkt er skyldig? Sammenlign også DNA-beviset med offerets DNA. Var bevis DNA forurenset med DNA fra offeret?

SIKKERHETSVEILEDNING

DNA
DNA-materialet som følger med i dette settet er helt trygt for skolene å benytte. Ingen levende organismer benyttes, slik at det ikke er nødvendig å benytte strenge sterile teknikker. Likevel er det viktig å følge gode rutiner slik at man hindrer kryss-forurensning mellom prøver. Dersom det søles DNA skal det tørkes opp skikkelig.Brukte prøverør og spisser kan kastes i vanlig søppel.

Agarosegel
Dersom du benytter en mikrobølgeovn til å smelte agarosen må du passe på at den plasseres i en uforseglet beholder. Dersom en mikrobølgeovn ikke er tilgjengelig kan du bruke vannbad eller varmeplate istedet. Når agarosen smeltes på denne måten må du røre i den underveis for å hindre at den brenner seg fast. NB! kke bruk en laboratoriebrenner til å smelte agarosen.

Varm, smeltet agarose kan brenne og skolle huden og må derfor behandles med varsomhet.

Elektroder
Karbonfiberelektrodene kan frigi små fibre som igjen kan gi små hudirritasjoner dersom man tar mye i dem. Dersom man vet at man lett kan reagere bør man benytte beskyttelseshansker. Fibrene er imidlertid for store til å komme inn i lungene, slik at det ikke er nødvendig å benytte ansiktsmaske. I tillegg er fibrene løslige i kroppsvæske og er fullstendig nedbrytbare.

Elektrisk tilkobling
Dette elektroforeseutstyret skal kun benyttes med lav spenning (≤ 45V) med tørrcellebatterier. Ikke under noen omstendigheter må denne spenningen overstiges, ettersom de elektriske komponentene ikke er isolert fra brukeren.

Dersom man kobler utstyret til en strømkilde kan det resultere i alvolig eller dødelig elektrisk sjokk.

DNA stain (Carolina BLU consentrat)
DNA fargen er *Carolina BLU konsentrat*. Når den benyttes som anvist vil den ikke representere noen sikkerhetsfarer. Likevel bør en vise hensyn slik at den ikke kommer i kontakt med hud eller øyne, bruk f.eks beskyttelsesbriller og engangshansker. Brukt DNA stain kan fortynnes med vann og skylles ut i avløp.

TBE bufferløsning (Tris-Borate-EDTA)
Når løsningen fortynnes og benyttes som breskrevet vil løsningen ikke representere noen sikkerhetsfare. Brukt bufferløsning kan skylles ut i avløp.

Tilleggsinformasjon
Mer informasjon om sikkerhet knyttet til det praktiske arbeidet med DNA kan finnes i følgende artikkel:

Horn, T.M. (1992). *Working with DNA and bacteria in a pre-college science classro*m.
National Association of Biologi Teachers

Og på NABT sin hjemmeside:

http://www.nabt.org/

Annen nyttig informasjon samt instruksjon for å tilpasse utstyret til bruk for studenter med svekket syn kan finnes på NCBE og Carolinas web sider:

www.reading.ac.uk/NCBE
www.carolina.com

PLEASE NOTE

The manufacturers of this product have made every effort to check that recognized hazards have been identified and that suitable precaution are suggested. Where possible, the proposed procedures are in accordance with commonly adopted general risk assessments. If a special risk assessment may be necessary, this has been indicated. However, users should be aware that errors and omissions can been made, and that different employers and educational authorities adopt different standards. Therefore before initiating any activity, users should always carry out their own risk assessment. In particular any rules issued by employers and educational authorities MUST be obayed, whatever else is suggested by the manufacturers.

VIDERE LESNING

Kreuzer, H. and Massey, 1996. *Recombinant DNA and biotechnolgy: A guide for Teachers*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC. See Chapter 18 and 24.

Mullis, K., 1990. *The unusual origin of polymerase chain reaction*. Scientific American 262(4): 56-65.

Nowak, R., 1994. *Forensic DNA goes to court with O.J.* Science 265:1352-1354.

National Centre for Biotechnology Education,
The University of Reading, Whiteknights,
Reading, The United Kingdom. Tel: + 44 118 9873743.

Carolina Biological Supply Company
2700 York Road
Burlington, North Carolina 27215-3398
United States of America
800.334.5551
www.carolina.com

Copyright © The University of Reading, 1998.
CB270700302