



UNIVERSITÉ DE FRIBOURG
UNIVERSITÄT FREIBURG

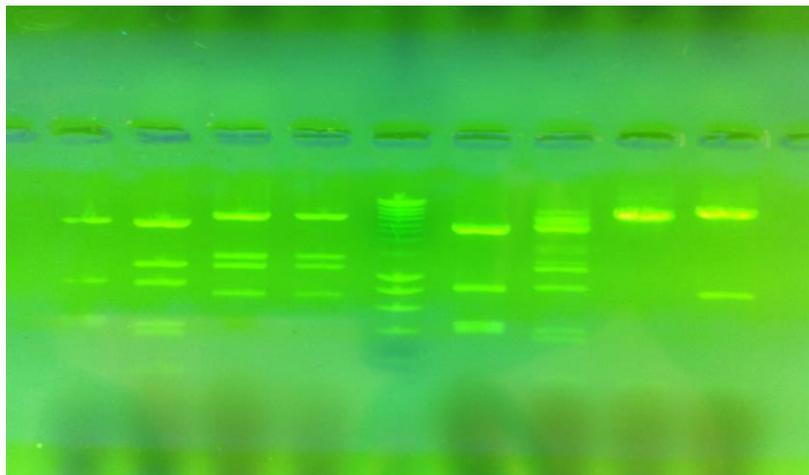
Themenkoffer: DNA

Eine Zusammenarbeit der Universität Freiburg
und dem Naturhistorischen Museum Freiburg

DNA in kriminalistischen Untersuchungen

Protokoll für SchülerInnen

Léonard Cardinaux, Adrien Pairraud, Marie-Pierre Chevron



Überarbeitung : Luc Le Grand Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild,
Dank : D^r Peter Wandeler, Jean-Christophe Lallement

INHALT

Dieses molekularbiologische Experiment dient der Illustration der Themen DNA, genetischer Spuren in der Kriminalistik und Restriktions-Enzyme und demonstriert die klassische RFLP-Technik (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus).

Die dazu gehörenden Unterlagen beinhalten die Anleitung der Arbeitsschritte und geben die Möglichkeit, Kenntnisse in folgenden Bereichen zu vertiefen: DNA, Restriktions-Enzyme, Anwendungen des Restriktions-Polymorphismus.



ANLEITUNG

Arbeitsblatt 1 : RFLP, Allgemeines Prinzip

Arbeitsblatt 2 : Material und Sicherheit

Arbeitsblatt 3 : Versuchsprotokoll



RESULTATE UND ÜBERLEGUNGEN

Arbeitsblatt 4 : Aufgaben



THEORIE

Arbeitsblatt 5 : Restriktionsenzyme und RFLP

Arbeitsblatt 6 : Elektrophorese in Agarose-Gel

Arbeitsblatt 7 : RFLP und Kriminalistik

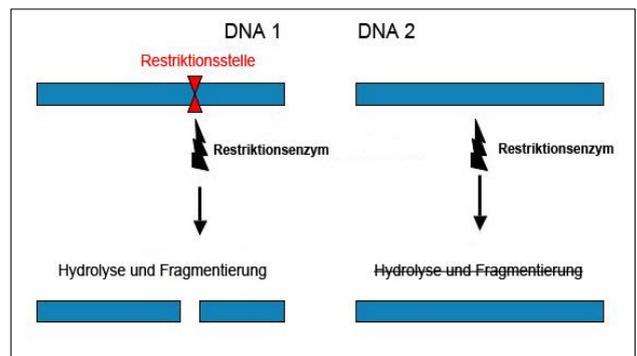


Vergleich von polymorpher DNA

Zwei DNA-Proben werden verglichen, um herauszufinden, ob sie sich in ihren Nukleotidsequenzen unterscheiden. Diese Analyse kann mit Proben von allen lebendigen Organismen durchgeführt werden. DNA-Vergleiche macht man beispielsweise bei einem Gen-Test zur Erforschung einer Krankheit, um Spuren eines Verbrechens zu untersuchen, um zwei Spezies (Tiere, Pflanzen, Bakterien, ...) zu vergleichen, usw.

Enzymatische Verdauung

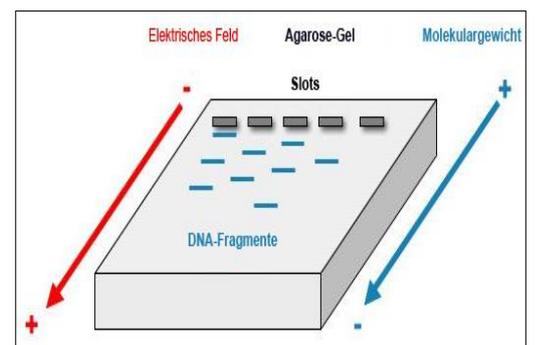
Die enzymatische Verdauung ist eine Technik, welche mittels Restriktionsenzymen DNA in Stücke schneidet. Ein Restriktions-Enzym erkennt eine bestimmte kurze DNA-Basen-Sequenz (Restriktionsstelle) und hydrolisiert diese, wobei jede Enzym-Art eine eigene Erkennungssequenz hat. Wenn also ein Restriktionsenzym zur DNA gegeben wird, so "sucht" es die Stellen, auf die es programmiert ist, und trennt die DNA an diesen Stellen durch. Wenn die DNA keine solche spezifische Stelle hat, bleibt sie intakt.



RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
Siehe Arbeitsblatt 5

Migration durch Elektrophorese

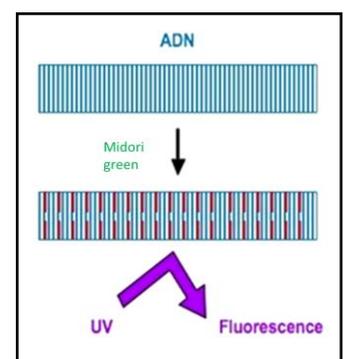
Die Fragmente, welche man durch die enzymatische Hydrolyse erhalten hat, werden in ein Agarosegel gegeben und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Darin bewegen und positionieren sie sich in Abhängigkeit von ihrem molekularen Gewicht (kleine Fragmente wandern schnell, große langsam). Die Beigabe eines blauen Farbstoffs zur DNA-Fragmente-Lösung erhöht die Dichte der Lösung, damit sie einfacher eingefüllt werden kann und visualisiert durch die Farbe die Bewegung der Fragmente im Gel.



Siehe Arbeitsblatt 6

Visualisierung der Fragmente

Die DNA-Fragmente sind für das bloße Auge nicht sichtbar. Um sie nach der Wanderung erkennbar zu machen, wurde dem Gel eine chemische Verbindung (Midori Green) beigegeben, welches an der DNA anhaftet und im UV-Licht fluoresziert. Es können auch andere Farbmarker verwendet werden.

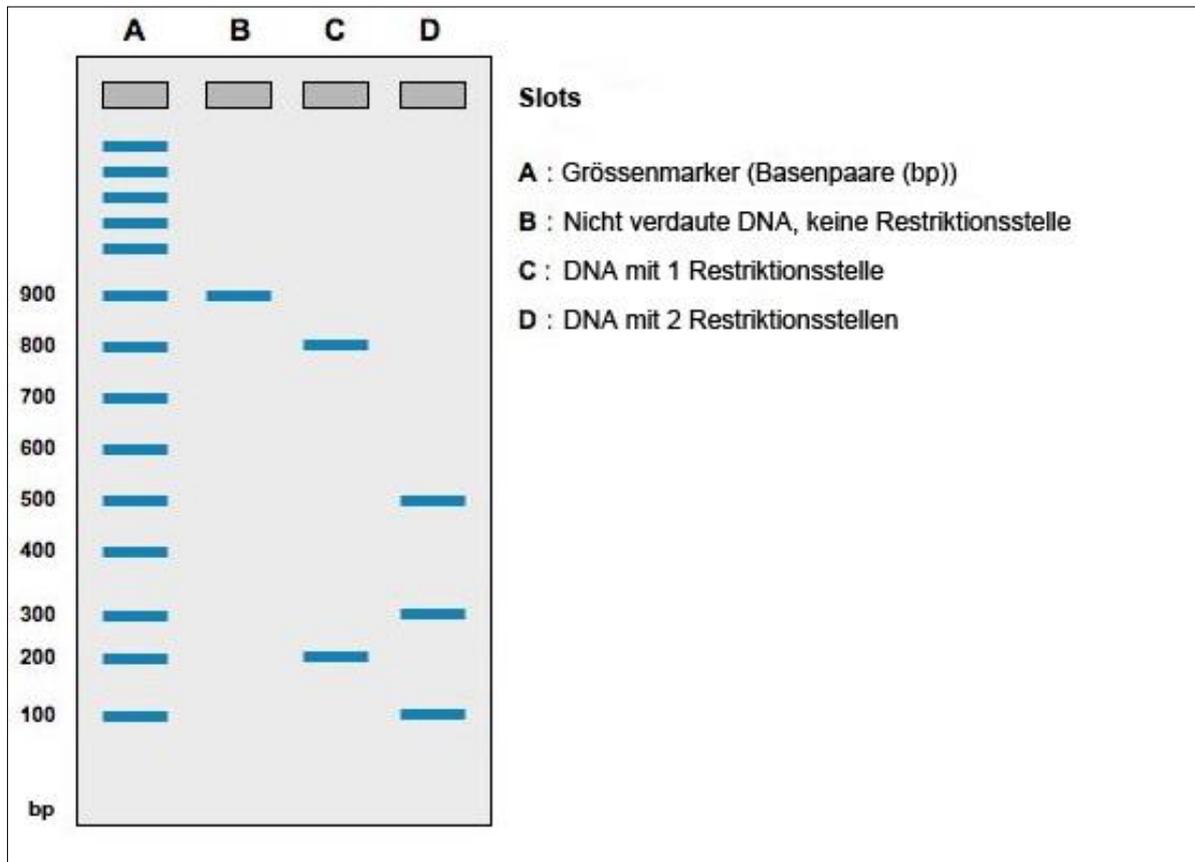


Analyse der Ergebnisse

Am Schluss liegen die Resultate in Form einer Fotografie vor, welche die im UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden zeigt.

Eine ungeteilte DNA-Probe erscheint als einzelnes Band. Eine hydrolisierte Probe zeigt zwei oder mehrere Stücke unterschiedlicher Grösse auf, je nachdem, wie viele Restriktionsstellen sie enthält.

Die Grösse der DNA-Stücke wird im Vergleich mit einem Referenzmarker, der aus DNA-Fragmenten mit bekannter und standardisierter Grösse besteht, bestimmt.





1. Sicherheit und Verhalten im Labor

Die Arbeit an den Experimenten dieses Lehrkoffers erfordert Disziplin, Vorsicht und striktes Einhalten der Hygiene- und Sicherheitsregeln. Folgende Anweisungen sind zu beachten:

- ✓ Labormaterial ist empfindlich und teuer.

Mit grösster Sorgfalt behandeln, vor allem Zentrifugen, Mikropipetten und Elektrophorese-Generatoren.

- ✓ Biologisches Material ist empfindlich auf Temperatur und Verunreinigungen.

Für Sauberkeit von Arbeitsflächen, Händen und Instrumenten sorgen.
Insbesondere für die Lagerung der Enzyme: Temperatur-Angaben beachten.
Alle Behälter klar beschriften: Inhalt, verantwortliche Person.

- ✓ Gewisse Apparate und Produkte sind gefährlich.

Latex-Handschuhe tragen, insbesondere bei der Arbeit mit dem Gel, welches Midori Green (krebserregend) in hoher Konzentration enthält.

UV-Strahlen können schwere Verbrennungen verursachen. Wer direkter Strahlung ausgesetzt ist, muss sich mit Handschuhen schützen.

Für die Arbeit mit Midori Green muss ein spezieller Arbeitsbereich eingerichtet werden. Insbesondere muss saugfähiges Papier unter den Elektrophorese-Gefässen ausgelegt werden. Vor dem Einräumen des Materials in den Koffer muss alles (Gefässe, UV-Kammer,...) gründlich gereinigt werden, um alle Spuren von Midori Green zu beseitigen.

Bei Unsicherheiten immer nachfragen !

2. Material

Labormaterial:

Micropipetten
Zentrifuge
Microtubes-Halter
Inkubator
Präzisionswaage
Mikrowellen-Ofen
Gel-Giessform und Kamm
Elektrophoresegefäss und -generator
Erlenmeyer-Kolben und Reagenzglas
UV oder LED-Kammer

Reagenzmittel und Verbrauchsmaterial:

Pipetten-Spitzen
Microtubes
Steriles destilliertes Wasser
TAE Buffer (Tris-Acetat, EDTA)
Agarose
Midori Green
Ladepuffer
Grössenmarker
Verdauungspuffer
Latex-Handschuhe

Biologisches Material:

DNA-Proben und Restriktionsenzyme PstI



1. Enzymatische Verdauung

- ✓ Pro Gruppe :
 1. 4 x « DNA 1, 2, 3, 4 », je 8 µl
 2. 1 x PstI 4 µl (Enzym)
 3. Verdauungsbuffer 10 µl
 4. Steriles H₂O

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Mischungen mit Hilfe einer Mikropipette in Microtubes erstellen. Die Spitze nach jedem Pipettieren auswechseln.

Die Volumenangaben ganz genau einhalten!

Probe	DNA	H ₂ O	Buffer	Enz. PstI	Gesamtvolumen
Verdächtiger 1	8 µl ADN1	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Verdächtiger 2	8 µl ADN2	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
Verdächtiger 3	8 µl ADN3	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl
DNA vom Tatort	8 µl ADN4	9 µl	2 µl	1 µl	20 µl

- ✓ Kurz zentrifugieren und die Proben bei 37°C während 20 – 45 Minuten inkubieren.

2. Zubereitung des Agarose-Gels – HANDSCHUHE OBLIGATORISCH

- ✓ Auf der Präzisionswaage Agarose abwiegen.
- ✓ Buffer TAE 1X abmessen.
- ✓ Im Erlenmeyer-Kolben Agarose und TAE mischen, dann das Gemisch im Mikrowellen-Ofen zum Sieden bringen (ACHTUNG, GEFAHR VON HEISSEN SPRITZERN!).
- ✓ Das Gemisch 2 Minuten abkühlen lassen, dann Midori Green hinzufügen (Handschuhe nicht vergessen!).
- ✓ Die Mischung vorsichtig in die Giessform umfüllen, ohne Luftblasen zu verursachen, Kamm befestigen und in Ruhe polymerisieren (fest werden) lassen. Sobald das Gel fest ist, kann es transportiert werden. Es kann bedeckt von einer Plastikfolie bei 4°C aufbewahrt werden. (Nie in einem Kühlschrank mit Esswaren lagern!)

Benötigte Mengen (hängt von der Grösse der Gel-Giessform ab):

Gel-Giessform	Agarose	TAE 1X	Midori Green
100 ml	0.65 g	100 ml	10 µl
80 ml	0.55 g	80 ml	8 µl
60 ml	0.4 g	60 ml	6 µl
50 ml	0.35 g	50 ml	5 µl
20 ml	0.15 g	20 ml	2 µl

3. Einfüllen der Proben und Elektrophorese – HANDSCHUHE OBLIGATORISCH

- ✓ Den Kamm sorgfältig aus dem verfestigten Gel ziehen – es entstehen Aussparungen im Gel, diese werden Taschen oder Slots genannt.
- ✓ Das Gel in das Elektrophoresengefäß legen.
- ✓ Das Gel mit TAE 1X bedecken (ca. 500 ml).
- ✓ Die verdauten Proben aus dem Inkubator nehmen und jeder Probe 4 µl Ladepuffer beifügen, kurz zentrifugieren.
- ✓ Vorsichtig 5 µl Grössenmarker in den ersten Slot pipettieren.
- ✓ Vorsichtig 20 µl der Probe in die Slots pipettieren, je ein Slot pro Probe. Dabei nach jeder Probe die Pipettenspitze wechseln.
- ✓ Das Elektrophoresengefäß schliessen und am Generator anschliessen (der negative Pol (schwarz) muss auf der Seite der Slots angeschlossen werden).
- ✓ Das Gel 30 Minuten bei 100 V wandern lassen (die Amperezahl wird automatisch geregelt).

4. Visualisierung der Fragmente – HANDSCHUHE OBLIGATORISCH

- ✓ Den Generator ausschalten und den Deckel des Gefässes entfernen.
- ✓ UV-Kammer: Das Gel in der Form aus dem Gefäß nehmen, abtropfen lassen, in die UV-Kammer legen und fotografieren.
- ✓ LED-Lampe: Das Gel im Elektrophoresen-Bad lassen und den LED-Deckel darauf legen und anschalten, fotografieren.



Kriminalistik: Gentest zur Identifizierung eines Verdächtigen

Im Rahmen einer kriminalistischen Untersuchung werden Sie von den Ermittlern gebeten, ihren Verdacht über ein Individuum durch das Erstellen eines genetischen Profils zu bestätigen. In unserem Experiment haben wir DNA-Spuren vom Tatort (DNA 4) und Proben der DNA von drei Verdächtigen (DNA 1, DNA 2, DNA 3).

F1 : Mit Hilfe von Blatt 7 „RFLP und Kriminalistik“:

- Geben Sie an, welches Gewebe die Ermittler dem Verdächtigen entnehmen können.
- Wieso kann man die roten Blutkörperchen nicht benutzen?

F2 : Vor der enzymatischen Verdauung waren mehrere experimentelle Schritte nötig. Welche?

F3 : Präzisieren Sie mit Hilfe von Blatt 6 “Elektrophorese in Agarose-Gel“:

- Wie ist die elektrische Ladung der DNA im Elektrophoresegefäß?
- Welcher Faktor bestimmt die Geschwindigkeit, mit welcher die DNA-Fragmente im Agarose-Gel wandern?

F4 : Welche spezifische Sequenzen des menschlichen Genoms werden für einen Gen-Test verwendet, um Personen zu identifizieren?

F5 : Stellen Sie ihre Resultate, die Sie aus der Visualisierung der Fragmente erhalten haben, schematisch dar.

Können Sie die wahrnehmbaren Unterschiede zwischen den Restriktionsprofilen der zwei Allele ausmachen?

Was schliessen Sie daraus für die mögliche Schuld einer der Verdächtigen? Welche alternativen Hypothesen oder zusätzlichen Experimente würden Sie vorschlagen?



Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, welche jedes DNA-Molekül an spezifischen Stellen schneiden. Diese Stellen nennt man Restriktionsstellen, und sie entsprechen kurzen spezifischen Nukleotid-Sequenzen von 4 bis 8 Nukleotiden.

Beispiele von Restriktionsstellen

PstI	XhoI
5' ...CTGCA▼G... 3'	5' ...C▼TCGAG... 3'
3' ...G▲ACGTC... 5'	3' ...GAGCT▲C... 5'

Die ersten Restriktionsenzyme wurden vom Schweizer Werner Arber 1962 entdeckt. Er zeigte, dass diese Enzyme dem Immunsystem von Bakterien dienen, sich gegen Viren (Phagen) zu verteidigen. Jedes Enzym kann die DNA von Phagen an einer bestimmten Restriktionsstelle schneiden.

1970 isolierte der Amerikaner Hamilton O. Smith zum ersten Mal ein Restriktionsenzym (HaeI) aus der Bakterie Haemophilus influenzae. Im darauf folgenden Jahr setzte es sein Landsmann Daniel Nathans zum Aufschneiden der DNA des Virus SV40 ein. Diese drei Forscher erhielten 1978 den Nobelpreis für Medizin.

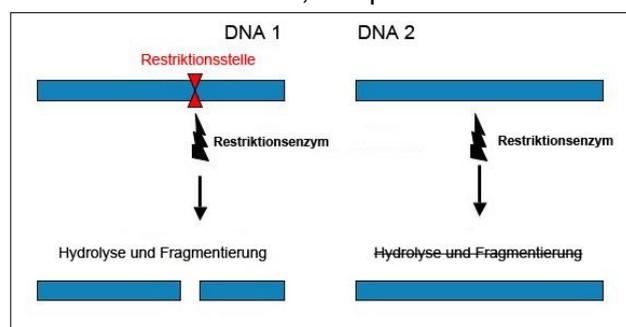
Seitdem wurden etwa hundert Restriktionsenzyme isoliert, regelrechte Molekular-Scheren, welche es erlauben, DNA beliebig zu schneiden, wodurch in der Gentechnik eine bemerkenswerte Anzahl Methoden entwickelt werden konnten. Unter diesen haben die RFLP-Techniken einen hohen Stellenwert

Restriktionspolymorphismus, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriktionspolymorphismen basieren auf spezifischen Eigenschaften von Restriktionsenzymen. Diese schneiden gleichermassen kodierende und nichtkodierende DNA, wo sie spezifische Restriktionsstellen erkennen, welche in kleinerer oder grösserer Zahl vorkommen können. Die kleine Grösse der Restriktionsstellen und ihre grosse Anzahl in einem Genom machen sie besonders empfindlich für jegliche Veränderung der Nukleotidsequenz: Mutationen durch Deletion, Insertion, Translation von Chromosomen.

Restriktionsenzyme werden also dafür gebraucht, Polymorphismen in DNA-Proben eines Genoms, eines isolierten Gens, eines Plasmids etc. sichtbar zu machen.

Die RFLP-Methode allein oder kombiniert mit anderen Techniken, hauptsächlich PCR und Hybridisierung, wird dazu benutzt, Arten, Varietäten und Individuen zu identifizieren. Durch RFLP können molekulare Stammbäume erstellt, gewisse genetische Krankheiten diagnostiziert, die Abstammung bestimmt oder bei kriminalistischen Untersuchungen der oder die Schuldige erkannt werden.



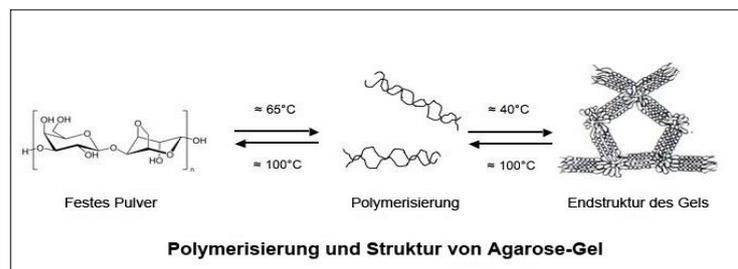


Mit dieser Methode können lineare DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht auseinander getrieben werden, indem man sie in porösem Gel einem elektrischen Feld aussetzt.

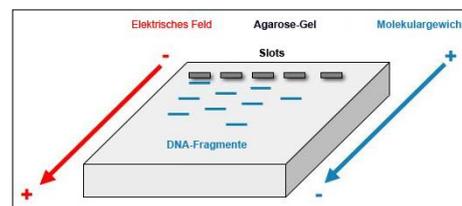
Das DNA Molekül ist ein Polynukleotid, jedes Nukleotid ist aus drei Bestandteilen aufgebaut: der Desoxyribose, der Nukleobase und dem Phosphatrest (H_2PO_4 , welches sich zu PO_4^{2-} ionisieren kann).

In basischem Milieu (der TAE-Puffer hat einen pH-Wert von gegen 8) lädt sich die DNA negativ ($H_2PO_4 \rightarrow 2 H^+ + PO_4^{2-}$) und wird zur Polyanion-Kette. Die elektrische Ladung ist gleichförmig, die Moleküle migrieren daher in Richtung Anode, darum werden die Slots auf der Seite der Kathode eingefüllt.

Agarose ist ein gelbildendes Polymer auf der Basis von purifiziertem Agar-Agar, welches im Wesentlichen aus nicht-verzweigt-kettiger Galactose besteht. Agarose wird aus der Zellwand bestimmter Rotalgen gewonnen. In weniger reiner Form wird sie zur Fabrikation von Chemischen Milieus für in vitro Kulturen und als Lebensmittelzusatzstoff (E406) verwendet.

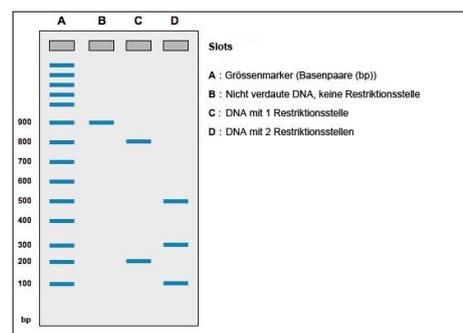


Die DNA-Migration unter Einfluss des elektrischen Feldes findet in der Schicht des porösen Agarose-Gels statt, worin die DNA platziert wurde. Die Poren des Gels wirken wie ein Sieb, welches die Wanderung der DNA-Fragmente bremst. Der Widerstand des Gels zur Wanderung der Fragmente ist proportional zu deren Größe; die kleinsten Fragmente wandern am schnellsten und somit am weitesten.



Die Agarose-Konzentration im Gel beeinflusst dessen Auflösung. Je konzentrierter die Agarose ist, umso besser werden kleine oder winzige, nur aus einigen Nukleotiden bestehende Fragmente, getrennt. Bei ungenügender Auflösung (zu wenig Agarose oder zu viel DNA) erhält man in der Regel eine Schliere („smear“). Die übliche Auflösungsgrenze liegt ungefähr bei 300Bp. Für feinere Trennungen werden im Allgemeinen Polyacrylamid-Gele verwendet.

Man kann erkennen, dass Dicke und Leuchtkraft der auf dem elektrophoretischen Profil visualisierten Streifen mit der Distanz zu den Slots abnehmen. Dies hängt mit bestimmten Eigenschaften von Midori Green zusammen: Es reagiert fluoreszierend auf UV-Strahlung und fixiert sich zwischen den DNA-Basen. Die Menge an Midori Green in jedem Streifen ist proportional zur Anzahl Nukleotiden der DNA, auf welchem es fixiert ist. Die Dicke und Leuchtkraft der Elektrophorese-Streifen, wie sie im UV/LED-Licht erscheinen, ist somit proportional zur Größe der DNA-Fragmente: die grössten Fragmente wandern am wenigsten weit.





Variable Regionen des menschlichen Genoms

DNA-Moleküle sind die Träger der genetischen Information, welche jedes einzelne lebende Individuum ausmacht. Das Genom besteht aus DNA, welche Proteine kodiert (=Gene), und solcher, welche nicht kodiert (zum Teil regulierende Regionen).

Die Gene (etwa 5% der DNA-Moleküle) sind sehr ähnlich von einem Individuum zum anderen. Sie werden in Messenger RNA transkribiert und dann in Proteine umgeschrieben. Diese Proteine haben schliesslich eine bestimmte Funktion.

Die nichtkodierende DNA macht den grössten Teil des Genoms (bis zu 95%) aus und es sind noch nicht alle Funktionen davon bekannt. Die regulierenden Regionen in den nichtkodierenden Teilen des Genoms spielen eine wichtige Rolle in der Regulieren der Expression der Gene (wo, wann, in welchen Mengen wird welches Gen aktiv).

Untersuchungen des nichtkodierenden Teils des Genoms haben ermöglicht, variable Regionen zu identifizieren: Es handelt sich um DNA-Segmente, welche durch Tandemwiederholungen von Grundeinheiten, bestehend aus zwei oder mehreren Nukleotiden, charakterisiert werden. Die Anzahl der Wiederholungen und damit die Grösse dieser Fragmente variiert stark von einem zum anderen Individuum (Allele). Diese starke Variabilität von einem Individuum zum andern ermöglicht es, ein genetisches Profil eines Individuums zu bestimmen. Nur bei eineiigen Zwillingen haben zwei Menschen identische DNA, sonst ist jeder genetische Fingerabdruck einzigartig.

Da jedes Restriktionsenzym die DNA an einer sehr spezifischen Stelle schneidet, werden diese Enzyme dazu verwendet, Sequenzvariationen zwischen zwei Allelen zu Tage zu fördern. Auf das gesamte Genom oder auch nur auf einige Regionen mit Wiederholungen angewandt, können mit Restriktionspolymorphismen schnell genetische Profile erstellt werden.

Anwendungen in der Kriminalistik

Die Rechtsmedizin benutzt genetische Fingerabdrücke von Verdächtigen, um sie mit den genetischen Fingerabdrücken von am Tatort gefundenen Spuren zu vergleichen. Wegen den unten genannten Vorbehalten dieser Technik kann dabei nur ein Verdächtiger entlastet werden und nicht seine Schuld bewiesen werden. Mit dieser Methode können auch menschliche Überreste identifiziert und Vaterschaft nachgewiesen werden.

Es gibt viele Gründe für die Polizeidienste, bei juristischen Untersuchungen mit genetischen Fingerabdrücken zu arbeiten:

- Mit Ausnahme von roten Blutkörperchen können alle Zellen des Körpers für eine Probe verwendet werden: Sperma, Blut (weisse Blutkörperchen), Haarwurzeln, Speichel (Epithelzellen), Haut, Knochenmark, Knochen, ...
- Da die DNA in jeder Zelle gleich ist, können Proben verschiedener Körperteile miteinander verglichen werden, wie zum Beispiel Blut und Sperma, Haar und Haut,... Es wurde jedoch kürzlich bewiesen, dass es doch Unterschiede in der DNA der verschiedenen Zellen des gleichen Körpers gibt (man spricht hier von

Mosaik). Diese Entdeckung bestätigt die Praxis, dass die genetischen Techniken nur als unterstützende Beweise in der Aufklärung einer Tat gebraucht werden dürfen und niemals als alleinige Beweise für eine endgültige Schuldzuweisung.

- Für eine Identifikation braucht es nur sehr geringe Mengen der genannten Substanzen.

Es würde zu lange dauern und wäre zu teuer, eine komplette genetische Karte eines Individuums zu erstellen. DNA-Tests in der Rechtsmedizin werden normalerweise auf etwa 15 nichtkodierende Regionen appliziert. Die Chancen sind also sehr klein, dass zwei Personen genau dieselben Sequenzen tragen und damit denselben genetischen Fingerabdruck für diese Regionen haben, aber die Möglichkeit kann nicht ganz ausgeschlossen werden. In naher Zukunft müssen diese Tests an verschiedene Regionen des Körpers entnommen werden, um falsche Schlüsse wegen Mosaik zu verhindern.

Da jedes Elternteil die Hälfte seiner DNA an seine Kinder weitergibt, wird auch bei Vaterschaftsuntersuchungen mit dem genetischen Fingerabdruck gearbeitet, sowohl im zivilrechtlichen (Beglaubigung oder Anfechtung einer Vaterschaft) als auch im strafrechtlichen Bereich (Vergewaltigungs- und Inzestfälle).