

Bakgrunn

Kriminalteknisk DNA analyse

Undersøkelse av DNA, arvestoffet vårt kan benyttes for å identifisere personer. DNA-analyse anses derfor å gi sikre bevis innen rettsgenetikk. Når man sammenligner DNA fra to personer, vil mer enn 99% av arvemateriale være identisk. Selv med så stor likhet er det likevel nok forskjeller til å gjøre hver enkelt persons genetiske sekvens unik. Dette gjør DNA-analyse til et viktig verktøy for å kunne identifisere enkeltpersoner.

Rettsgenetikere kan finne og isolere DNA fra biologiske spor på åsteder, som for eksempel en blodflekk eller et hårstrå, og bruke informasjonen i DNA-et for å matche prøven med en bestemt person.

Korte repeterende basesekvenser (STR - Short tandem repeats)

DNA er arvestoffet vårt, og finnes i alle cellene våre, unntatt de røde blodcellene. Av DNA'et er det kun mellom 1-2 % som består av gener som koder for egenskaper (som f.eks hudfarge, anlegg for sykdom etc). Utenom disse områdene finner vi områder som består av korte repeterende DNA-sekvenser. De fleste moderne DNA-analyser innen rettsgenetikk fokuserer på disse **korte repeterende basesekvenser (forkortes heretter til STR fra den engelske betegnelsen; Short tandem repeats)**. STR-områder er korte sekvenser, vanligvis 2 til 5 DNA-baser, som gjentar seg flere ganger etter hverandre (Figur 1). Hvor mange ganger basene gjentas varierer imidlertid mellom mennesker. Derfor varierer også lengden på DNA der STR-områdene befinner seg, mellom mennesker. Rettsgenetikere måler disse lengdeforskjellene for å sammenligne DNA mellom individer. Det er finnes mange slike lokasjoner i DNA'et vårt hvor antall kopier på ett spesifikt STR-område varierer mellom mennesker.

Rettsgenetikere gir hvert STR-område ett komplekst navn som reflekterer dens bestemte posisjon i genomet. Her gjør vi det litt enklere og refererer til ett eksempel som STR 1. Ved denne lokasjonen finner vi at sekvensen GATA repeteres et sted mellom 5 og 16 ganger (figur 1).

STR 1

5 REPEATS

..... GATA GATA GATA GATA GATA

6 REPEATS

..... GATA GATA GATA GATA GATA GATA

7 REPEATS

..... GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA

UP TO 16 REPEATS

Figur 1. Korte repeterende basesekvenser (STR)

STR er korte DNA-sekvenser som repeteres flere ganger etter hverandre. For eksempel, STR 1 er en spesifikk lokasjon i DNA'et vårt hvor sekvensen GATA blir gjentatt mellom 5 og 16 ganger.

Ett *allel* er en variant av en DNA-sekvens som finnes på en bestemt posisjon (lokus) på et kromosom. Rettsgenetikere refererer til STR-alleler ved antallet repeterende basesekvenser (STR) de inneholder. La oss ta eksemplet med STR 1; hvis det er 5 GATA-gjentakelser, vil rettsgenetikere si at det er en "5" allel. Fordi mennesker har to kopier av hvert kromosom, en arvet fra hver biologiske forelder, har mennesker to alleler for hvert STR-område. Forskere bruker begrepet genotype for å referere til forskjellige kombinasjoner av alleler som en person kan ha. For eksempel vil noen som er "9, 9" på STR 1 ha arvet 9 GATA-repetisjoner fra hver forelder. På den annen side vil noen som er "5, 9" på STR 1 ha arvet 5 GATA-repetisjoner fra den ene forelderen og 9 GATA-repetisjoner fra den andre forelderen (Figur 2).

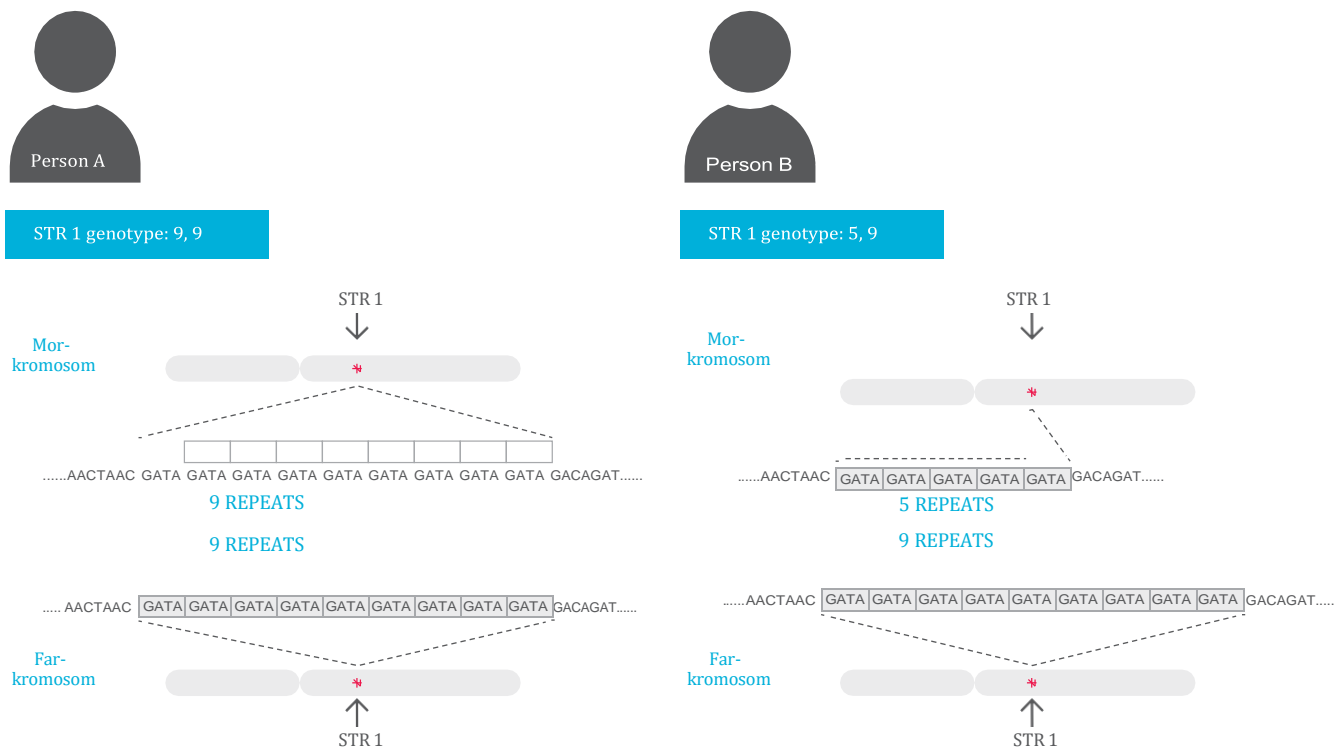


Figure 2. STR genotyper

Mennesker har to alleler for hver STR-region i genomet. Allelene kan være like eller de kan være forskjellige. Person A har to kopier av samme allel for STR 1, og deres genotype er 9, 9. Person B har to ulike alleler for STR 1, og deres genotype er 5, 9.

Ikke-kodende regioner av genomet

Når vi tenker på DNA, tenker vi ofte på gener, som inneholder kodende instruksjonene for å produsere RNA og proteiner. Imidlertid koder flertallet av genomet *ikke* for proteiner. Forskere omtaler dette DNA-et som ikke-kodende DNA. Ikke-kodende DNA kan ha mange funksjoner. For eksempel kan ikke-kodende DNA være involvert i genregulering eller ha en strukturell rolle, som å beskytte endene av kromosomer. Det finnes også mange regioner av ikke-kodende DNA der forskere ikke vet hva funksjonen er, eller om det i det hele tatt har en funksjon. Viktig er det at disse ikke-kodende regionene varierer mer mellom individer enn kodende regioner. Av denne grunn analyserer rettsgenetikere ikke-kodende regioner av genomet når de lager DNA-profiler.

I kriminalteknisk etterforskning undersøker man om en persons STR-område samsvarer med DNA-bevisene. Ved å sammenligne antallet repetisjoner på flere steder i genomet kan man opprette en unik DNA-profil som benyttes for genetisk identifisering (Figur 3). Jo flere STR-regioner som sammenlignes, desto større sannsynlighet er det for å finne forskjeller mellom personers STR-profiler.

Politiet kan sammenligne DNA-profiler (også kalt STR-profiler) fra DNA-bevis med DNA fra en mistenkt hvis de har det. Om det ikke er en mistenkt vil politiet sjekke DNA-profilen fra åstedet mot DNA-profiler som er lagret i politiets eget DNA-register. Det norske DNA-registeret ble etablert i 1998. DNA-registeret er delt i et identitetsregister, et etterforskningsregister og et sporregister, og består av DNA-profiler fra både dømte og mistenkte personer. I tillegg samles det inn DNA-profiler fra biologiske funn knyttet til uopklarte saker. Per november 2022 var ca. 140 000 personer registrert i det norske DNA-registeret (Bioteknologirådet, 2023).

STR location	Bevis genotype	Mistenkt 1 genotype	Mistenkt 2 genotype
STR 1	5, 8	5, 8	5, 8
STR 2	12, 13	12, 13	14, 14
STR 3	11, 12	11, 12	12, 12
STR 4	12, 12	12, 12	12, 12
STR 5	12, 18	12, 18	12, 18
Resultat		Match	No match

Figure 3. Eksempel på STR-profil

Etterforskere sammenligner STR-genotyper ved flere lokasjoner og varierende sekvenser for å bestemme om DNA-prøver kan stamme fra same person. I eksempelet her viser STR-profilen at mistenkt 1 kan ha vært kilden til DNA-sporet, mens mistenkt nr 2 ikke matcher beviset.

Bioteknologirådet, 2023.

<https://www.bioteknologiradet.no/temaer/dna-analyser/>

Hvordan lage en DNA-profil

En DNA-analyse starter med at politiet sender en biologisk prøve, som for eksempel et hårstrå, sædrester eller en blodflekk, til et laboratorie hvor rettsgenetikere kan utarbeide en DNA-profil. Forskere åpner cellene og ekstraherer DNA-et for analyse (Figur 5). Heldigvis trenger forskere bare en liten mengde DNA for analyse. For eksempel har forbrytelser blitt oppklart ved å bruke DNA fra en enkelt øyevippe eller spor av spytt på en sigarettneip. Nøkkelen til dette er en teknikk kalt polymerase kjedereaksjon (PCR). PCR gjør det mulig for forskere å lage mange kopier av spesifikke regioner av DNA.

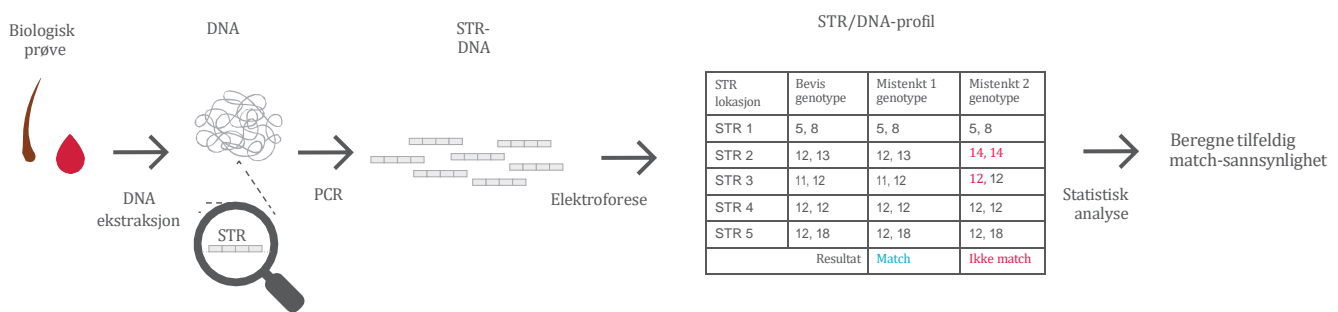


Figure 5. Arbeidsmetode ved kriminalteknisk DNA analyse

DNA blir ekstrahert fra en biologisk prøve. Deretter benyttes PCR for til å lage mange kopier av bare de områdene i genomet med STR som rettsmedisinske forskere ønsker å analysere. En elektroforese skiller de kopierte STR-DNA-ene etter lengde og gjør det mulig for rettsmedisinske forskere å bestemme STR-genotypene. Hvis det er en DNA-match, utfører rettsmedisinske forskere statistiske beregninger for å bestemme styrken til DNA-bevisene og sannsynligheten for å få en tilfeldig match.

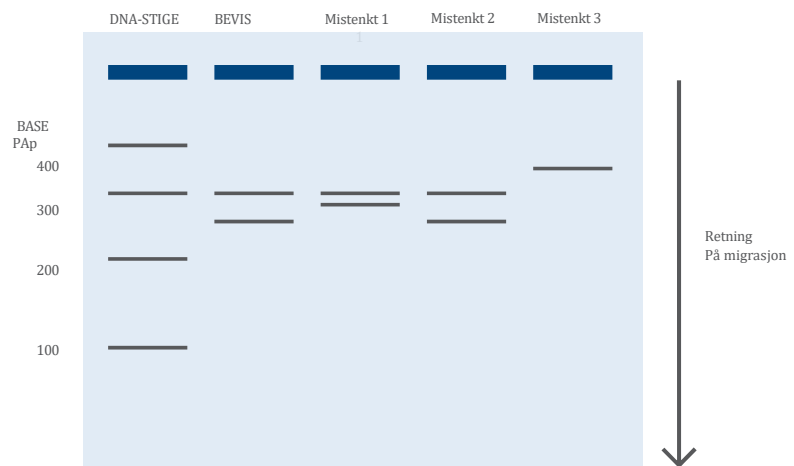
PCR gjør det mulig for rettsmedisinske forskere å ta en prøve, for eksempel en bloddråpe, som inneholder all DNA-et til en person, og deretter kopiere bare de 20 forskjellige STR-lokasjonene de er interessert i. Etter PCR skilles de ulike DNA-fragmentene etter lengden (størrelsen) ved hjelp av elektroforese (Figur 5).

Etter PCR gjennomføres en elektroforese, hvor forskere kan separere en blanding av DNA-fragmenter basert på lengde. Forskere bruker gjerne en gel laget av agarose, en polysakkarid ekstrahert fra tang, som danner et nettverk av tråder. Et elektrisk felt får de negativt ladde DNA-fragmentene til å migrere gjennom geleen mot den positive elektroden. Mindre DNA-fragmenter beveger seg enkelt gjennom agarose-nettverket og migrerer raskt gjennom geleen. Lengre DNA-fragmenter blir fanget i agarose-nettverket og migrerer derfor langsommere gjennom geleen.

Elektroforesen vil avsløre "bånd" av DNA-fragmenter, der de kortere DNA-bitene er plassert lenger fremme i geleen (Figur 6). Ved å inkludere en blanding av DNA-fragmenter med kjente størrelser, kjent som en DNA-stige, er det mulig å beregne størrelsen på ukjente DNA-fragmenter som finnes i prøvene.

Husk at STR-allelene varierer basert på antall repetisjoner, og DNA-et fra et STR-allel med flere repetisjoner vil være lengre enn DNA-et fra et STR-allel med færre repetisjoner (Figur 2). Gel-elektroforese lar forskere visualisere disse lengdeforskjellene og skille mellom STR-allelene. Geleen vist i Figur 6 viser resultater for en enkelt STR-lokasjon hvor man har skilt DNA-prøver fra 3 mistenkte og DNA fra en bevisprøve. Figuren forteller oss at DNA fra bevisprøven, mistenkt 1 og mistenkt 2, har to ulike alleler for dette STR-område siden DNA-prøvene viser to bånd av forskjellige størrelser. Videre kan vi se at mistenkt 3 har to kopier av samme allel på dette STR-område, fordi det bare vises ett bånd på geleen.

Når man sammenligner DNA fra åstedet med DNA fra mistenkte, kan de unike båndmønstrene raskt eliminere mistenkte hvis STR-profilen deres ikke samsvarer med bevisene. Tilbake til figur 6, så samsvarer DNA-fragmentene til mistenkt 1 og mistenkt 3 ikke med bevisene. Disse kan dermed utelukkes som kilde til DNA-beviset. For mistenkt 2 samsvarer DNA-båndene med beviset, noe som betyr at mistenkt 2 ikke kan utelukkes som kilden til DNA-bevisene.



Figur 6. Tolkning av elektroforesen:
Denne geleen viser resultater fra undersøkelse av en enkelt STR-lokasjon. Ved å sammenligne mønsteret av bånd fra DNA-bevisene med DNA-et til mistenkte, kan rettsgenetiske forskere utelukke mistenkte 1 og 3. Imidlertid samsvarer mistenkt 2 med DNA-bevisene og kan ikke utelukkes fra videre etterforskning.

Det er viktig å huske at kriminaltekniske undersøkelser vanligvis undersøker minst 20 STR-områder for å lage en komplett DNA-profil.

Selv om en person sin komplette DNA-profil matcher DNA-bevisene, beviser det ikke deres skyld. Hvis rettsmedisinske forskere får en DNA-match, er siste steg i den kriminaltekniske undersøkelsen å beregne hvor vanlig den spesifikke DNA-profilen er (Figur 5). Sannsynligheten for tilfeldig match representerer sjansen for at to ikke-relaterte personer deler samme STR-profil. Dette tar hensyn til antallet STR-lokasjoner som sammenlignes, antallet forskjellige alleler for hver STR-lokasjon og hvor vanlige hver allel er i den generelle befolkningen. Moderne DNA-analyse kan gi genetiske profiler som statistisk sett er svært sjeldne, på størrelsesordenen én til mange trillioner. For mer informasjon om statistikken knyttet til STR-profiler, se utvidelsesoppgaven om sannsynlighet og DNA-profiler.

Husk imidlertid at selv om den statistiske analysen sterkt antyder en DNA-match, beviser det fortsatt ikke mistenktes skyld. Det indikerer bare at mistenktes DNA var til stede på åstedet.

Oppgaver - forberedelse til laboratoriet

Gjennomgang

1. Hvorfor er det viktig å sammenligne forskjellige områder av DNA'et hvis du prøver å identifisere noen?

2. Beskriv hvordan du kan gjenkjenne en kort repeterende basesekvens (en STR) innenfor en DNA-sekvens.

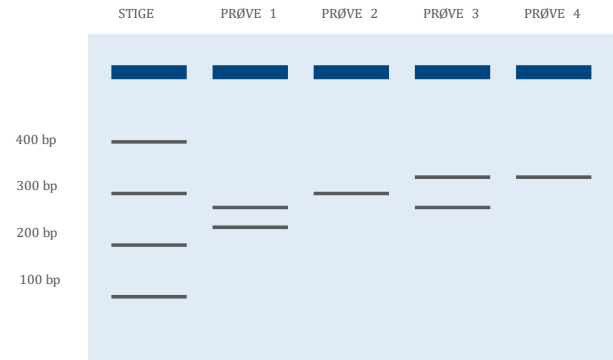
3. Hvordan forklarer du at forskjellige alleler kan variere innenfor samme STR-område?

4. Hvorfor er gel-elektroforese et bra verktøy for å skille mellom alleler i samme STR-område?

Kritisk tenkning

5. Sak: Elektroforese ble brukt til å separere DNA-fragmenter fra ett enkelt STR-område, som vi vil kalle "STR 1".

A. Hver person har to alleler for STR 1. Hvilke prøve(r) kommer fra en person der de to allelene er forskjellige fra hverandre? Forklar ved hjelp fra figuren.



B. Hvilke prøve(r) kommer fra en person der de to allelene er like? Forklar ved hjelp fra figuren.

C. Kommer noen av prøvene fra personer med same genotype. Forklar.

D. Har noen av prøvene like alleler? Hvis ja, tegn en sirkel rundt dem på gelen, og forklar hvordan du kan se dette.

6. Når man startet å utføre genetiske analyser i rettsmedisin undersøkte man ca. 13 STR-områder. Etter hvert har etterforskere utvidet det for å inkludere 20 steder (20 i USA, ofte 21 i Norge). Hvorfor tror du etterforskere ønsket å sammenligne flere steder når de leter etter DNA-matcher?

7. Hva kan du konkludere med hvis en mistenkts STR-profil ikke samsvarer med DNA-bevis fra åstedet på ett enkelt STR-sted?

8. Hva kan du konkludere med hvis en mistenkts STR-profil samsvarer med DNA-bevis fra åstedet på alle 20 STR-områdene?

Dagens lab

Først etter 2000-tallet er DNA-analyse blitt en standard-metode som benyttes i kriminaletterforskning. I saker som stammer fra tiden før bruk av DNA-analyse, kan det fortsatt samles inn DNA fra fysiske bevis som har vært oppbevart over lang tid. I mange etterforskninger har ny DNA-analyse av gammelt bevis ført til oppklaring av uløste saker som tidligere var uløselige. I andre tilfeller har ny DNA-analyse i avsluttede saker ført til frifinnelse av feilaktig dømt personer. I dag skal du bruke gel-elektroforese for å avgjøre om DNA fra en fengslet person samsvarer med nylig ekstrahert DNA fra gammelt åstedbevis.

Saken

-

I 1999 ble en ung mann brutalt angrepet og kvalt i en bakgate. Offeret ble funnet bevisstløs og alvorlig skadet, men overlevde. Offeret fortalte politiet at gjerningspersonen hadde på seg ansiktsmaske/tørkle, var veldig høy og hadde en skadet fortann. En maske som ble funnet i en søppelkasse i bakgaten ble samlet som bevis.

Senere samme uke fikk politiet tips om en person, J.M., som gikk nedover gaten i nærheten av åstedet. J.M. lignet beskrivelsen av gjerningspersonen, og han ble tatt med inn for avhør. J.M. ble pekt ut av offeret fra et utvalg av personer på grunn av hans skadde fortann, selv om offeret aldri hadde sett mannens ansikt pga masken. Det ble i tillegg funnet flere hår på en maske som ble oppdaget i bakgaten. Mikroskopisk analyse av håret fra masken ble sagt å stemme overens med en hårprøve samlet fra J.M. Basert på denne bevisførselen fant juryen J.M. skyldig.

J.M. ble dømt for forsøk på drap og soner for øyeblikket en livstidsdom i et amerikansk fengsel. J.M. har hele tiden hevdet sin uskyld, og etter år med anker, har retten nå godkjent hans forespørsel om DNA-analyse av bevisene fra saken hans. Du har fått tilsendt DNA fra fire prøver: en celle prøve fra innsiden av J.M. kinn, en tilsvarende prøve fra offeret og DNA fra to hår som ble funnet på masken. DNA-et du skal teste i dag har allerede vært gjennom en PCR-prosess og DNA'et du har nå representerer en enkelt STR-lokasjon.

Det er nå din oppgave å sikre at rettssystemet ikke feiler I denne saken. Kan du bevise om J. M. er uskyldig?

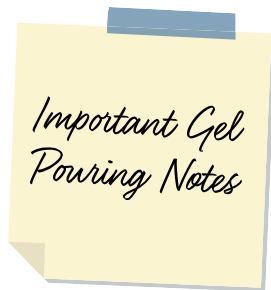


Fremgangsmåte



Du bør bruke hansker og briller under hele eksperimentet.

Støpe agarosegel

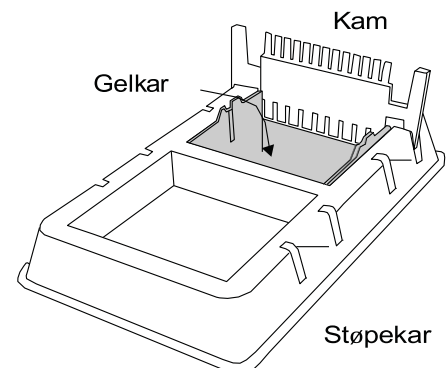


Geler kan tilberedes opptil tre dager på forhånd og oppbevares i romtemperatur, og dekket med lufttett plastfolie. Bør også beskyttet mot lys.

Du vil trenge 4 brønner pluss en brønn for DNA-stigen per gruppe. Hvis gruppene deler en gel kan gruppene dele en brønn for DNA-stigen.

Disse instruksjonene er utformet for bruk med blueGel™ elektroforese-systemet fra miniPCR bio™. Hvis du bruker et annet elektroforese-system, kan disse instruksjonene måtte justeres i henhold til produsentens instruksjoner.

1. Lag 1X TBE-buffer
 - TBE-buffer kommer ofte i konsentrert væskeform, eller som pulver.
 - Følg bruksanvisning fra lærer for å lage 1X TBE-buffer løsning.
2. Finn frem ett rent og tørt støpekar, et gelkar og en kam
 - Plasser gelkaret i det hvite støpekaret.
 - Plasser en kam i enden av støpekaret.
3. Lag en 2% agarose-løsning som inneholder fluorescerende DNA farge (e.g., SeeGreen™ or GelGreen®). Følg fremgangsmetode som læreren gir dere.

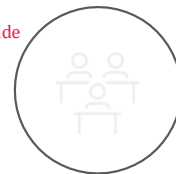


VIKTIG: Det er flere metoder for å støpe agarosegeler.

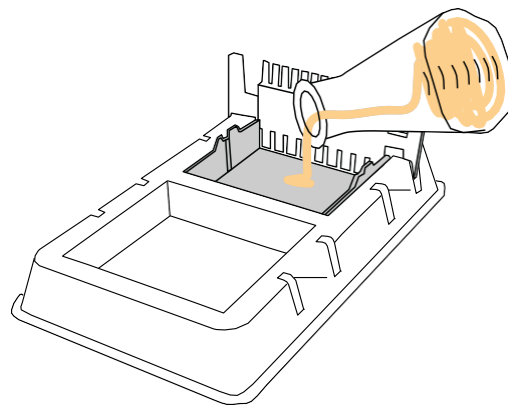
- Scann QR-koden for detaljert instruksjon om hvordan agarose geler kan lages.
- Instruksjoner finnes bade som video og som skrevne dokumenter.



www.minipcr.com/agarose-gel/



4. Hell agarose-løsningen I støpekaret med gelkar og kam plassert som bilde viser. Det er viktig at støpekaret står på rett og jevnt underlag.
 - Agarose-løsningen skal dekke de nederste 3 mm av "tennene" på kammen.
5. La gelen stå I ro helt den er stivnet. Deretter kan du fjerne kammen forsiktig
 - Gelen vil normal være stivnet etter ca 10 minutter.
 - Gelen er klar når den er avkjølt og fast når du tar på den.



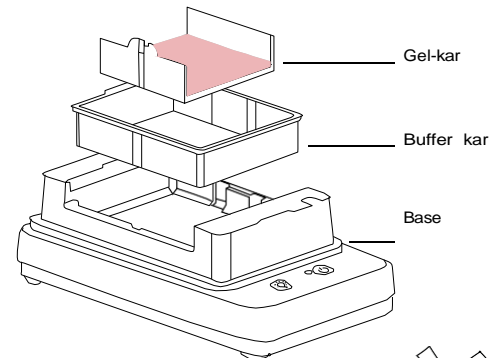


Du bør bruke hansker og briller under hele eksperimentet.

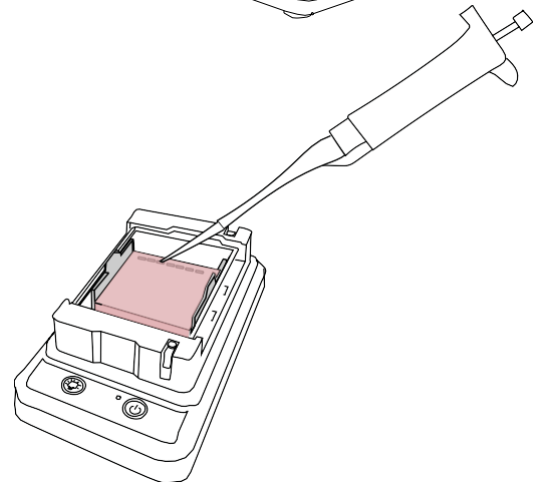
Kjøre elektroforese

Disse instruksjonene er utformet for bruk med blueGel™ elektroforese-systemet fra miniPCR bio™. Hvis du bruker et annet elektroforese-system, kan disse instruksjonene måtte justeres i henhold til produsentens instruksjoner.

1. Plasser gelkaret med din gel i buffer-karet
 - Sørg for at buffer-karet er plassert i blueGel™ elektroforese-system.
 - Brønnene i gelen skal være på samme side som den negative elektroden, det vil si på motsatt siden av På-knappen.



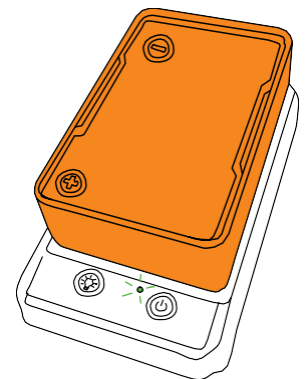
2. Tilsett 30 ml 1X TBE elektroforese-buffer
 - Bufferen skal akkurat fylle gelen og brønnene.
 - Sørg for at det ikke er noen luftbobler i brønnene (dersom det er bobler i brønnene beveg hele karet forsiktig litt frem og tilbake for å spreke boblene).




3. Bruk en mikropipette til å overføre innholdet fra prøverørene til brønnene. Bruk en ny pipettespiss for hvert rør. NB! Det kan være lurt å øve seg noen ganger med å fylle og tømme en pipettespiss med vann, før du begynner med DNA prøvene. Fyll brønnene i følgende rekkefølge:


- Brønn 1: 10 µl Fast DNA Ladder 1 (DNA-stige)
 - Brønn 2: 10 µl victim DNA (DNA fra offeret)
 - Brønn 3: 10 µl J.M. DNA (DNA fra mistenkt)
 - Brønn 4: 10 µl DNA Evidence 1 (bevis 1)
 - Brønn 5: 10 µl DNA Evidence 2 (bevis 2)
- NB:** Prøvene inneholder allerede loading dye.

4. Sett på det oransje lokket på blueGel™ elektroforese-system
 - For å unngå dugg-dannelse anbefales det å spraye på ClearView™ på innsiden av lokket, og stryk utover før man setter det på.
 - Sørg for at positiv og negativ elektrode tegnet på lokket stemmer overens med de positive og negative tegnene på den blå basen.
 - Det oransje lokket skal sitte helt tett til den blå basen, sett fast, men uten å bruke makt.






5. Trykk på "Run"  knappen
 - Sjekk at det grønne lyset ved siden av Power-knappen forblir opplyst.

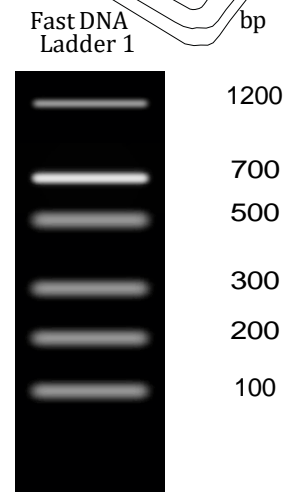
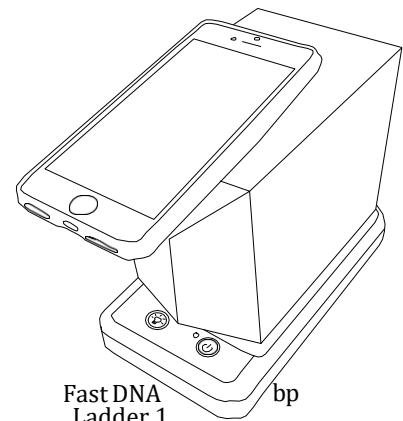
6. Kjør elektroforesen i 15-25 minutter
 - NB: Sjekk fremdriften til prøvene dine hvert 10. minutt for å overvåke hvor langt DNA-prøvene dine har vandret. Dette gjøres ved å trykke på "light bulb" -knappen.
 - Å kjøre elektroforesen lengre enn 25 minutter vil resultere i bedre separasjon av DNA-fragmenter med lik størrelse. Imidlertid kan små DNA-fragmenter komme helt til enden av gelen, eller miste noe av sin fluorescens hvis de kjøres for lenge.

Synliggjør resultatene

1. Trykk "light bulb" -knappen for å slå på blueGel™ belysningen.
 - For best mulig visning, demp lyset eller bruk Fold-a-View™-hetten sammen med en smarttelefon med kamera.
 - Dersom bildet er uklart, tørk innsiden av det oransje lokket og påfør ClearView™ spray på nytt.

2. Sørg for tilstrekkelig oppløsning av DNA-båndene i området 200-400 bp på DNA Ladder 1 (DNA_stigen)
 - Kjør gelen lengre hvis nødvendig for å øke oppløsningen.

3. Dokumenter resultatene dine:
 - Sammenlign DNA-båndene med DNA-stigen. Slik vil du kunne få et estimat på størrelsen på DNA-fragmentene.
 - Plasser Fold-a-View™ hetten over elektroforeseboksen og ta bilde med en smarttelefon eller digitalt kamera.

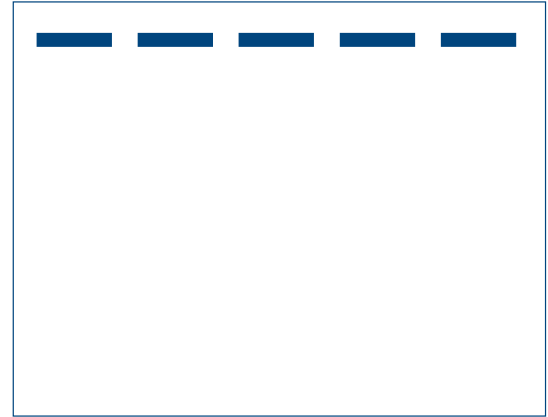




Oppgaver – etter laboratoriearbeidet

Tolke resultater

1. Bruk figuren til høyre for å illustrere resultatene av gel-elektroforese. Sørg for å merke hver brønn med hvor prøven stammer fra.



2. Sammenlign DNA fra J.M., med DNA-beviset fra åstedet. Hva kan du konkludere med?

Kritisk tenking

3. Hvorfor tror du det er nyttig å analysere offerets DNA hvis det er tilgjengelig?

4. Hvis du jobbet med denne saken, hva vil ditt neste steg være? Forklar.

