

# CSI

WAT IS EEN DNA VINGER AFDruk  
WETEN IS WINNEN  
Goele CAETHOVEN  
C.APERS 15 LL  
6WEWI

# Inleiding

Elk jaar neemt het Sint-Michielscollege Brasschaat deel aan 'Scientists@work'. Onze leerkracht, mevrouw Apers, doet dit elk jaar met één van haar klassen. In september hoorden we dat wij zouden deelnemen dit jaar. Enkele maanden later vernamen we het thema waarrond we gingen werken. 'CSI: Wat is een DNA vingerafdruk?' luidde het. Dit thema werd goed ontvangen in de klas. We hadden allemaal al wel eens de Amerikaanse CSI gezien dus leek het ons leuk om het zelf ook eens te mogen proberen. Naast het thema kregen we ook te horen dat het onze beurt was op maandag 28 februari.

Om 9 uur op die maandag in februari stapten 15 enthousiaste leerlingen de campus voor toegepaste wetenschappen en onderwijs van de Plantijnhogeschool binnen. We begonnen onze dag met een korte herhaling, gegeven door mevrouw Caethoven, over DNA en we kregen te horen wat we precies gingen doen die dag. We gingen op zoek naar een dader wiens DNA was gevonden op de 'crime scene'. We moesten deze vinden uit 4 verdachten. Tijdens onze zoektocht maakten we kennis met 4 nieuwe technieken: DNA-amplificatie via PCR, het programmeren van dit toestel, het maken van een agarosegel en de analyse via elektroforese.

Nadat wij de dader hadden geïdentificeerd, vertelde mevrouw Caethoven wat we precies hadden gedaan. We kwamen te weten dat 99,5% van ieders DNA identiek is maar dat er verschillen zijn. Deze verschillen worden polymorfismen genoemd en hiernaar waren wij op zoek gegaan. Meer bepaald waren wij op zoek gegaan naar één polymorfisme. Deze methode kan ook gebruikt worden voor paterniteitstesten. Wij maakten er één samen met mevrouw Caethoven. Deze test wordt in het dagelijkse leven vaak aangevraagd.

In het echte leven gaat het er weliswaar anders aan toe. Vaak is het geval dat er te weinig DNA of teveel van verschillende personen aanwezig is of teveel vermenging waardoor er geen profiel kan opgesteld worden. Dan worden alle fragmenten onderzocht en niet enkel één fragment zoals wij deden. Na dat onderzoek wordt er een advies gegeven over de dader. Zij zullen nooit zeggen dat 'Jan' de dader is maar wel dat 'Jan' de grootste kans heeft de dader te zijn. De onderzoekers kunnen nooit uitsluitel geven over de dader hoewel de kans op toeval kleiner is dan 1/wereldbevolking, zij zullen wel een advies geven. Wij wilden met onze klas iets dieper in gaan in één bepaalde tak van wat we allemaal geleerd hadden en we besloten unaniem dat het CSI ging worden. Wij namen contact op met deskundige dr. Jehaes om haar enkele vragen te laten beantwoorden.

# Materiaal

- ▶ 20 µm DNA van de Crime Scene (SC)
- ▶ 20 µm DNA van verdachte A, B, C en D
- ▶ 100 µm MMP (Master Mix + Primers)
  - ▶ Taq polymerase
  - ▶ dNTP's
  - ▶ Buffer
  - ▶ Primers
  
- ▶ 50 µm OG (Orange G)
- ▶ Snel fixerende gel
  - ▶ 2 g agarose
  - ▶ 20 ml 50x TAE-Buffer
  - ▶ Aanvullen tot 1l met gedeïoniseerd water
  
- ▶ Electroforesekamer
- ▶ Micropipet
- ▶ SYBR Safe (Fluorescerende vloeistof)
- ▶ Centrifuge
- ▶ Amplificator
- ▶ Pipetteerpuntjes (2-20 µm)
- ▶ Fixatiebakje
- ▶ Kammetje
- ▶ PCR-werkstation
- ▶ Epjes
- ▶ Instelbare Stroombron (100V)
- ▶ Weegschaal
- ▶ Erlenmeyer

# Methode

Op de crime scene is DNA verzameld van de dader. Door het te vergelijken met het DNA van de mogelijke daders kunnen we met grote zekerheid bepalen wie de echte dader is. In de DNA-stalen, zowel van de crimescene als van de verdachten, zit te weinig genetisch materiaal om meteen een vergelijkende test uit te voeren. Daarom moeten we de hoeveelheid genetisch materiaal vermeerderen door middel van een Polymerase Chain Reaction (PCR). De DNA-stalen worden bewaard in epjes (figuur 1.1).



1.1 PCR-werkstation met epjes

## De PCR



1.2 Centrifuge met epjes

Door middel van een centrifuge zorgen we ervoor dat al het verzamelde genetisch materiaal zich onderaan de epjes bevindt. De centrifuge moet altijd helemaal gevuld zijn (figuur 1.2), anders geraakt zij uit balans.

Vervolgens brengen we in kleinere epjes 20µl van elk DNA-staal en voegen we aan elk epje vervolgens mastermix en primers (MMP) toe (figuur 1.3). De MMP is een mengeling van: een buffer (die de pH-waarde regelt), deoxynucleotiden, TAQ-polymerase (een polymerase-eiwit dat ongevoelig is voor hoge temperaturen) en primers.



1.3 MMP toevoegen aan de epjes



1.4 Amplificator

Bij een PCR gaan we op een kunstmatige manier DNA repliceren. Dit kunstmatige proces volgt net dezelfde stappen als die bij de natuurlijke vorm van DNA-replicatie, in de celkern net voor celdeling, plaatsvinden. Nadat we de epjes met de DNA-stalen hebben klaargemaakt voor de PCR plaatsen we ze in de Amplificator (figuur 1.4). We geven de machine de volgende instellingen: 1. Een denaturatieperiode van 120 seconden op 94°C 2. 30 cycli van een denaturatieperiode van 30 seconden op 94°C gevolgd door een periode van 30 seconden 'annealing time' op een temperatuur van 52°C en een elongatieperiode van 60 seconden op 72°C. 3. Een finale extensieperiode van 300 seconden op 72°C. Na de PCR is er voldoende genetisch materiaal in de epjes aanwezig om de stalen te vergelijken.

## Snel fixerende gel

De gel bestaat uit agarose, gedeïoniseerd water en een 50x TAE-buffer. De buffer zorgt ervoor dat er door de gel stroom kan lopen, wat belangrijk is voor de elektroforese. Eerst meten we 20 ml van de TAE-buffer af en vullen die aan met gedeïoniseerd water tot 1l. Van dit mengsel nemen we 50 ml in een erlenmeyer en voegen er de 2g agarosepoeder aan toe om de gel te maken (figuur 1.5).



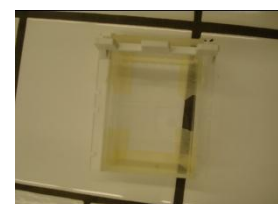
1.5 Afwegen 2g agarosepoeder



Die gaat de microgolfoven in: we koken het mengsel zodat de waterstofbruggen breken en de agarose ermee kan binden (figuur 1.6). Als we hard genoeg koken zijn er geen luchtballen in de nu nog vloeibare gel, koken we te hard, dan kan het overkoken.

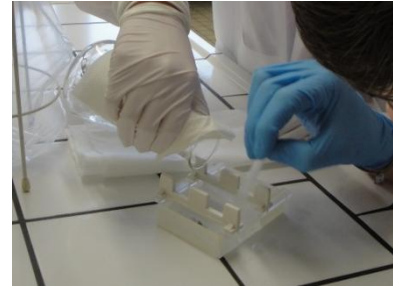
1.6 bereiden van de gel in de microgolfoven

We gieten de gel in het fixatiebakje met het kammetje erin (figuur 1.7). Het kammetje zorgt ervoor dat we uitsparingen ('slots') in de gel krijgen.



1.7 Fixatiebakje

Eén minuut lang kunnen we de eventuele luchtbellen er uit halen, anders is het geen homogene gel (figuur 1.8). Na vijftien minuten is de gel afgekoeld en ziet er troebel uit.



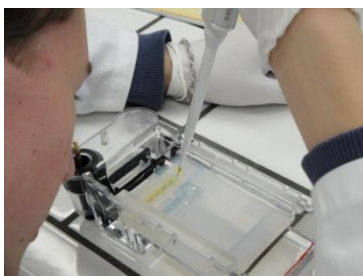
1.8 Gel uitgieten

## Gel elektroforese

De gel gaat dan in een elektroforesekamer (figuur 1.9) die gevuld is met de 50x TAE-Buffer. We letten er op dat de uitsparingen naar de negatieve pool van de kamer gericht zijn. We vullen de uitsparingen in de gel met de DNA-fragmenten.



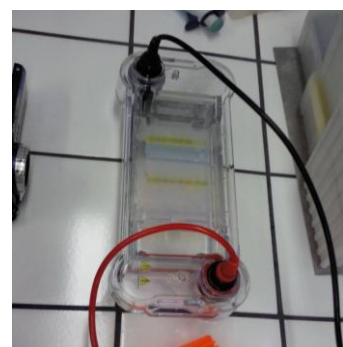
1.9 Elektroforesekamer



De eerste uitsparing vullen we met een ladder, de tweede met het DNA-fragment van de Crime Scene, de andere gaatjes vullen we met de DNA-fragmenten van de verdachten, respectievelijk één per uitsparing (figuur 1.10).

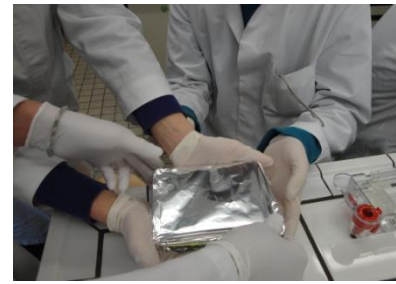
1.10 Vullen van de uitsparingen ('slots')

We sluiten de kamer af (figuur 1.11) en zetten er een gelijkspanning van 100V op. Het DNA dat negatief geladen is zal op basis van verschillende elektroforetische mobiliteit door de gel worden getrokken. De DNA-fragmenten die het langst zijn zullen er langer over doen om de door de gel te geraken en de kortste zullen er minder lang over doen. Om te weten waar het kortste fragment zich bevindt, gebruiken we Orange G. Deze kleurstof is kleiner dan het kleinste DNA-fragment, en zal dus als eerste het einde van de gel bereiken.

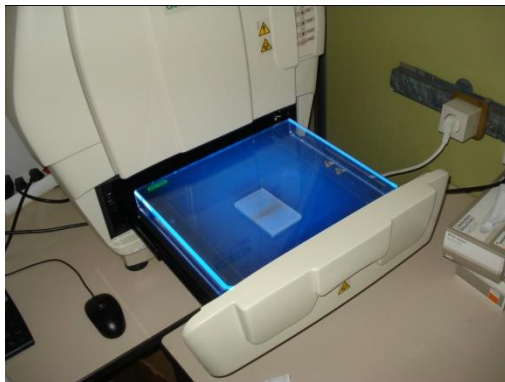


1.11 Afgesloten kamer

Zo krijgen we een bandenpatroon, dat voor ons weliswaar nog niet zichtbaar is, hiervoor moeten we de gel in een bad fluorescerende vloeistof (SYBR Safe) leggen, afdekken met zilverpapier (figuur 1.12) zodat .

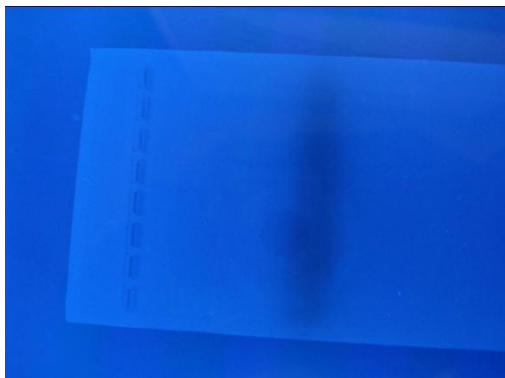


1.12 Afgedekte gel in SYBR Safe



1.13 UV-bak

Zo worden de DNA-fragmenten zichtbaar in combinatie met UV-licht (figuur 1.13/1.14).



1.14 Close-up UV-bak

# Resultaten

## Proces in de PCR-machine

Dit proces noemen we PCR (Polymerase Chain Reaction) en zal in de PCR-machine plaats vinden:

	Temperatuur (°C)	Tijd (s)	Aantal cycli
Denaturatie	94	120	1
Denaturatie	94	30	30
PCR annealing	52	30	
Elongatie	72	60	
Finale extensie	72	300	1
Bewaren	4	∞	1

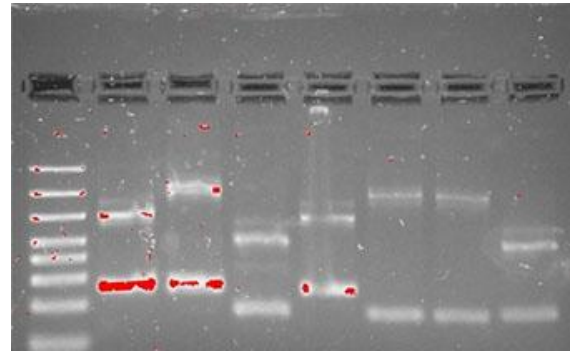
Op 94°C zal het DNA denatureren zonder dat er beschadiging optreedt. De H-bruggen zullen worden verbroken. Vervolgens zal er een proces van drie stappen dertig keer herhaald worden bestaande uit denaturatie, PCR annealing en elongatie. De denaturatie zal hetzelfde effect hebben als de denaturatie in het begin, alleen zal deze minder lang duren. Vervolgens wordt de temperatuur verlaagd tot 52°C. Dit wordt gedaan omdat de primers zich het best vastzetten op het DNA op deze temperatuur. Dit noemen we de PCR annealing. Tenslotte is er nog de elongatie. De temperatuur stijgt terug tot 72°C en zorgt voor de optimale werking van het polymerase. Dit polymerase is afkomstig van bacteriën (*Thermus aquaticus*, kortweg TAQ) uit een warmwaterbron. Hun enzymen zijn temperatuurrezistent bij deze hoge temperaturen. Deze drie stappen worden herhaald om een overmaat aan een welbepaald stukje DNA te krijgen. Nadat het dertig keer herhaald is geweest, is het tijd voor de finale extensie. Deze gebeurt op dezelfde temperatuur en neemt vijf minuten in beslag. Dit zorgt ervoor dat elk stukje zijn complement aan zich gebonden heeft en dat er dus geen enkelstrengige stukjes DNA meer overblijven. Tenslotte is het tijd om de stukjes DNA te bewaren op een temperatuur van 4°C en dit voor onbepaalde tijd.

## Migreren in de gel

Tijdens het migreren nemen we ook een ander chemisch verschijnsel waar. Er zal een elektrolyse van water plaatsvinden. Aan de positieve kant van de batterij kunnen we H<sub>2</sub> waarnemen en aan de negatieve kant is er O<sub>2</sub>. Dit zien we in de vorm van gasbelletjes. Verder zien we ook dat het deksel begint aan te dampen door de warmte.

## Eindresultaat

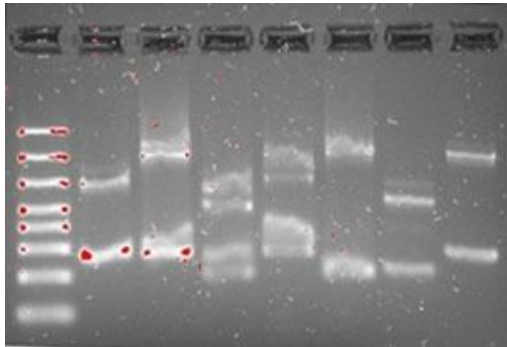
Door het toevoegen van de kleurstof (ethidiumbromide) kunnen we de Short Tandem Repeats, van het DNA dat we gerepliceerd hebben, zien na belichting in de UV-kamer. Aan de linkerkant (figuur 3.1) zien we de ladder die alle mogelijke lengtes weergeeft. In ons geval zijn er dus acht mogelijkheden. Elke volgende kolom bevat



3.1 vader A B C D D B

twee streepjes. Dit komt doordat alle geteste personen heterozygoot zijn (dus verschillende allelen bezitten) voor de onderzochte fragmenten. In de kolom ernaast zien we het DNA van de vader. De volgende vier kolommen zijn de verdachten en dan nog twee willekeurige verdachten, gekozen door de leerlingen zelf, als controle. Na vergelijking van de verschillende kolommen kunnen we zien dat het DNA van verdachte C overeenstemt met dat van de vader. Zijn DNA-fingerprint komt overeen.

Het DNA is negatief geladen en wordt dus aangetrokken door de positieve pool van de batterij. Daardoor gaat het door de gel heen migreren. De kleinste stukjes gaan het snelst, in tegenstelling tot de grotere die trager gaan. Daardoor kan men dus de twee verschillende allelen van elkaar scheiden en vergelijken met die van de anderen. Moesten we maar één streepje zien, weten we dat de persoon homozygoot is. Dit komt omdat zijn onderzochte allelenparen evenveel herhalingen bevatten.



3.2 vader A B C D B A

Bij sommige groepen zien we ook zeer brede, uitgelopen lijntjes (fig.3.2). Dit verschijnsel noemt men ontdubbeling en is een artefact. Het komt doordat er te lang gewacht werd om de stroom aan te sluiten nadat men het DNA in de gel had aangebracht of te traag de slotjes heeft gevuld. Het DNA trok vanzelf al een beetje in de gel langs weerskanten. Hierdoor zien we twee troebele lijntjes vlak tegen elkaar in plaats van één zuivere lijn.

# Conclusies

## Conclusie

Na interpretatie van de DNA-profielen kunnen we met grote waarschijnlijkheid zeggen dat persoon C de dader is. Na de migratie van de geamplificeerde DNA-stalen zien we dat bepaalde fragmenten ontdubbeld zijn. Dit is te wijten aan het feit dat wij nog geen ervaren laboranten zijn. Wij hebben te lang gewacht met de elektrodes te plaatsen, hierdoor was het DNA in de eerst gevulde slotjes al op eigen kracht naar de + en de – pool gediffundeerd. Door dan pas spanning over het systeem te zetten, startte de elektroforese te laat en migreerden de ontdubbelde DNA-fragmenten achter elkaar. Hadden we sneller gepipetteerd, dan hadden we, bij het bekijken met UV-licht, slechts één streepje per DNA-staal gezien.

## Verder nut van deze methode

Op de plaats delict van een misdaad kan deze methode worden aangewend. Vooreerst wordt, na een ernstige misdaad zoals een moord of verkrachting, de plaats delict afgezet en mag enkel bevoegd personeel van de forensische dienst van de politie de site betreden. Deze onderzoekers dragen een witte wegwerpoverall met een kap, een bril en latex handschoenen om zelf geen sporen als eigen haren enz. achter te laten. Zij zoeken naar materiaal dat mogelijk DNA kan bevatten zoals haren, bloedvlekken en speeksel en in het bijzonder bij een verkrachting naar spermaresten of schaamharen. Het haar is enkel bruikbaar indien het haarzakje nog intact is, want daar zit het mitochondriaal DNA zoals in het cytoplasma van elke lichaamscel. Uit bloedstalen kan men dan weer enkel de witte bloedcellen gebruiken omdat actieve rode bloedlichaampjes geen celkern meer hebben. In speeksel is het wangepitheel bruikbaar.

Met het kernmateriaal in de gevonden stalen wordt een DNA-profiel van de vermoedelijke dader gemaakt. Van het slachtoffer, en eventueel ook de mensen van de forensische dienst die de site hebben betreden, kan een zuiver DNA-profiel worden opgesteld om geen verwarring te laten ontstaan. Van deze laatste onschuldige personen kan je het makkelijkst een staal nemen van het wangepitheel met behulp van keelwissers.

DNA extractie ofwel het DNA isoleren uit cellen gebeurt in drie stappen. Eerst dient de cel opengebroken te worden zodat het materiaal binnenin vrijkomt. Dit kan door middel van lyse wat wil zeggen de dood van een cel door het breken van het membraan. Dit kan in een hypotonische oplossing gebeuren waardoor de cellen zich volzuigen met water door osmose en exploderen. Ook het omgekeerde principe, cellen in een sterk hypertone oplossing brengen waardoor de cellen zullen inkrimpen, wordt gebruikt om de te onderzoeken cellen te lyseren. Bij forensisch onderzoek worden aan de cellen stoffen toegevoegd die het celmembraan aantasten zoals bepaalde enzymen of chemische stoffen, veelal zouten, met de werking van een detergent. Deze methode wordt chemische lyse genoemd. Vervolgens worden de lipiden, afkomstig van de membranen, met behulp van een oplosmiddel, een detergent, uit de oplossing geëxtraheerd. Een voorbeeld van een detergent is zeep. Tenslotte wordt het opgeloste DNA neergeslagen door toevoeging van bijvoorbeeld isopropanol of ethanol. Na centrifugatie ontstaat een witte band met DNA. De afgewerkte stalen worden bewaard in de diepvrieskast o.a. om bacteriegroei te voorkomen.

Het DNA bij mensen onderling is voor 95 procent identiek. Die andere vijf procent kunnen worden gebruikt bij het opstellen van een DNA-profiel aangezien deze vijf procent ons even uniek maakt als onze vingerafdrukken. Zo ook verschilt onze oogkleur, haarkleur, iris, oorafdruk enz. Tegenwoordig maakt men een DNA-patroon op basis van 14 tot 15 merkers, afkomstig van die specifieke allelen die elk hun locus hebben op een specifiek chromosoom. Men bekomt dan, op basis van elektroforese van deze 'persoonlijke' fragmenten, een uniek bandenpatroon. Afhankelijk van de lengte van deze specifiek "uitgezochte" stukjes ( ook wel STR of short Tandem Repeats genoemd) van de verdachte kan men deze vergelijken met de lengte van het gevonden DNA-patroon. Deze methode wordt ook gebruikt bij paterniteits- of materniteitstesten. Bij een paterniteitstest bezit men dan bijvoorbeeld de zuivere patronen van moeder en kind(eren) waaruit men dan het patroon van de vader kan bepalen en welk allel papa heeft doorgegeven per locus.

# Literatuurstudies

## Echt CSI-werk duurt langer dan één tv-aflevering

*“In de tv-reeks 'CSI Miami' zou hoofdinspecteur Horatio Caine hem binnen de 50 minuten achter de tralies hebben. Realistisch? 'De technieken in deze politiereeksen bestaan echt, maar met de uitvoering wordt vaak een loopje genomen.”*

[www.bit.ly/eK18Kz](http://www.bit.ly/eK18Kz)

## First Person Exonerated With DNA Evidence Shares Story, Advocates to Repeal Death Penalty

*“Wrongfully convicted of murder and facing execution, an innocent man fought for his life and eventually won his freedom.”*

*“Bloodsworth was the first death row inmate to be exonerated using post-conviction DNA testing.”*

[www.bit.ly/eRI5jH](http://www.bit.ly/eRI5jH)

## Cracking crimes with a new DNA technique

*“Although forensic DNA analysis is used in less than one percent of all criminal cases, it has helped convict suspects in some of the world's most heinous crimes, including murder and rape.”*

*“But a new technique developed at the [Hebrew University of Jerusalem](#) by a professor and his student takes the uncertainty out of DNA samples, when more than one person's DNA fingerprint is in the mix.”*

*“The technique consists of investigating the DNA mixture and the suspect's DNA for 1000-3000 single letter changes (polymorphisms), which are considered relatively rare in any population.”*

*“Current DNA fingerprinting methods look at only a few polymorphic sites to see if there is a match. Darvasi's invention looks deeper into the sample to establish with a very high level of certainty whether or not a suspect's DNA is in a mixture of up to 10 people.”*

[www.bit.ly/g3gri3](http://www.bit.ly/g3gri3)

# Referenties

- ▶ [www.bit.ly/156p5](http://www.bit.ly/156p5)
- ▶ [www.bit.ly/eEDT0E](http://www.bit.ly/eEDT0E)
- ▶ [www.bit.ly/gGXmez](http://www.bit.ly/gGXmez)
- ▶ [www.bit.ly/gbU4cW](http://www.bit.ly/gbU4cW)
- ▶ [www.1.usa.gov/howPaG](http://www.1.usa.gov/howPaG)

# Samenvatting

We hebben met onze klas deelgenomen aan het project: *“CSI: wat is een DNA vingerafdruk?”*.

Vertrekkende van een DNA-staal, gevonden op de crime scene en het DNA-staal van onze vier verdachten zijn we op zoek gegaan naar de mogelijke dader, waarvan het DNA op de crime scene werd gevonden. Hierbij zullen we een DNA-profiel opstellen van de dader. Dit is in de realiteit niet zo eenvoudig, omdat je op de plaats van het onderzoek ontzettend veel sporen kan vinden. Hierbij bestaat de kans dat je een profiel zal opstellen van iemand die onschuldig is.

Ook de zeer kleine hoeveelheid gevonden DNA speelt een rol.

Tijdens de studiedag aan de Plantijnhogeschool hebben we eerst een korte theoretische les gekregen over de PCR-methode die we later die dag in de praktijk gingen toepassen. Ook onze kennis over DNA werd tijdens de les even opgefrist.

Na de theoretische les mochten we aan de slag in het labo.

Bij dit labo-onderzoek startten we met het vermeerderen van de gekregen DNA-stalen door middel van een polymerasekettingreactie. Deze reactie bestaat erin bouwstenen (primers) toe te voegen aan het DNA-staal en daarna in de PCR-machine 30 maal dezelfde temperatuursveranderingen te laten ondergaan. Deze reactie is exponentieel, dus bij elke cyclus wordt meer DNA verdubbeld door replicatie.

Terwijl deze reactie liep, maakten we de agarosegel.

Deze gel heeft zeer kleine poriën, waardoor het DNA kan gescheiden worden op basis van grootte. Het langste polymorfisme zit bovenaan en het kortste onderaan. Op basis van deze lengteverschillen kunnen we de DNA-patronen vergelijken. Voor we het DNA inbrengen in onze agarosegel, voegen we een kleurstof toe om het kleurloze DNA te visualiseren.

Wanneer dit gebeurd is, vullen we het elektroforesetoestel met een buffermengsel. In dit bufferbad leggen we de agarosegel, brengen de verschillende DNA-stalen samen met een ladder aan in de hiervoor voorziene uitsparingen in de gel, en zetten onder gelijkstroom. De ladder dient als referentie om de verschillende lengten DNA te onderscheiden.

Na de elektroforese leggen we de gel in een badje met SYBR Safe en dekken dit af van het licht. Deze SYBR Safe is een fluorescerende vloeistof die het DNA zal laten oplichten bij UV-straling. Wanneer we de gel met UV-licht bekijken, zien we 2 overeenkomstige DNA-profielen doordat de polymorfismen van het DNA op de crime scene en dat van een van de verdachten hetzelfde zijn. Nu hebben we, via de PCR-techniek, de dader opgespoord!

# Voorstelling groep: WEten is Winnen

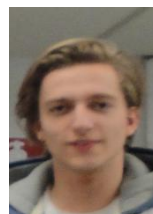


## TAAKVERDELING

### Inleiding



Lieven van Himme



Sebastiaan Delvaux

### Materialen en methoden



Ruben Nijs



Philippe Verpooten

### Resultaten



Nick Van den Eede



Stijn Lefever

## Conclusies



Mathias Verstappen



Tom Verboven

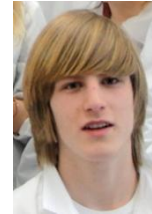
## Referenties



Anke Goormans



Bart Helwig



Maxime Gueutal

## Samenvatting



Marthe Ceulemans



William Olyslager

## Voorstelling Groep



Bruna Machado Clabost



Arnout Devos

## Begeleidende Leerkracht



Christel Apers

## Begeleidster Project



Goele Caethoven