



# DNA- profilanalyse

UNIT 2

*European Initiative for Biotechnology Education*

---

**Bidragydere til denne unit**

**Dorte Hammelev (koordinator af denne unit)**

**Dean Madden, Søren Nørby, Jill Turner**



***EIBE (The European Initiative for Biotechnology Education) søger at fremme viden og forståelse, og facilitere en nuanceret offentlig debat gennem forbedret undervisning i bioteknologi på det gymnasiale niveau i hele den europæiske union.***

## EIBE-Kontakter



### **BELGIEN**

| Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.



### **DANMARK**

| Dorte Hammelev, Foreningen af Danske Biologer, FaDB, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.  
| Lisbet Marcussen, Foreningen af Danske Biologer, FaDB, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



### **FRANKRIG**

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.  
| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boîte Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



### **HOLLAND**

| David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.  
| Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.  
| Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotechnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT.



### **IRLAND**

| Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.



### **ITALIEN**

| Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.



### **LUXEMBOURG**

| John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.



### **SPANIEN**

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño / Rosa M. Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



### **STORBRITANIEN**

| Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.  
| John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.  
| Jill Turner, School of Nursing and Midwifery, 1-3 College Park East, The Queen's University of Belfast, Belfast, BT7 1LQ.  
| Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING RG7 1AE.



### **SVERIGE**

| Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV.  
| Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, S-45181 UDDEVALLA.



### **TYSKLAND**

| Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Regina Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.  
| Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.  
| Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behaghel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



### **ØSTRIG**

| Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.

## EIBE Koordinator

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Tyskland. Telefon: + 49 (0) 431 880 3166 (EIBE Sekretariat: Regina Rojek). Fax: + 49 (0) 431 880 3132.



# DNA- profilanalyse

UNIT  
2

*European Initiative for Biotechnology Education*

MATERIALER

## Indhold

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

I	Forfattere, copyright og sikkerhed	4
I	DNA-profilanalyse	
	Introduktion og baggrund	6
	Teknologien	10
I	Klassisk-profilanalyse	
	RFLP-analysemetoden	12
	Eksempler	14
I	Moderne DNA-profilanalyse	
	PCR-teknikken	16
	For og imod PCR	18
I	DNA-profilanalyse i praksis	
	Hvor sikker er konklusionen?	20
	Analyse af mitokondrie-DNA	22
	Zar Nikolai II og hans familie...	23
I	Diskussion	24
I	Litteraturliste	25
I	Modelforsøg	
	Lærervejledning	25
	" Pige myrdet..." elevforsøg	26

2. udgave afsluttet januar 1998

## World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Få områder udvikles så hurtigt som bioteknologien. EIBE Units formidles elektronisk, så de nemt kan opdateres, mens omkostningerne holdes på et minimum.

Disse sider (og andre EIBE Units) kan fås over hele Europa og resten af verden på World Wide Web:

<http://www.eibe.reading.ac.uk:8001/>

Alle EIBE Units på WWW findes i PDF-format. Det betyder, at alle high-quality illustrationer, farver, skrifttyper og layout på disse dokumenter vil bevares på alle computere (Macintosh - incl. Powermac, Windows, DOS eller Unix-platforme).

PDF-filer fylder mindre, så de kan hentes (downloades) på kort tid. For at læse PDF-formatet skal du have programmet Adobe Acrobat © Reader 3.0. Det kan gratis hentes på engelsk, hollandsk, fransk, tysk eller italiensk fra:

<http://www.adobe.com/>

Du kan læse og udskrive EIBE Units med dette program. Du kan desuden let bevæge dig rundt i dokumenterne.

BEMÆRK: Adobe og Acrobat er varemærker for Adobe Systems Incorporated. Macintosh er registreret varemærke for Apple Computer Incorporated.

# Udviklingsgruppe



- Dorte Hammelev (koordinator)  
Frederiksberg HF kursus  
Danmark
- Dean Madden  
NCBE, The University of Reading  
U.K.
- Søren Nørby  
Antropologisk Laboratorium  
Retsmedicinsk Institut  
Københavns Universitet  
Danmark
- Jill Turner  
School of Nursing and Midwifery  
The Queen's University of Belfast  
UK

Design, illustrationer og layout: Dean Madden og Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, RG6 6AJ

2. udgave er omskrevet og opdateret af Søren Nørby på både dansk og engelsk.

Dansk redaktion Dorte Hammelev.

## Tak til:

Knud Johnsen for megen inspiration. Laboratorieeksperimentet "*Pige myrdet efter skolefest*" er en videreudvikling af Knuds "Find Morderen" som indgik i hans og hans elevers vinderprojekt i Teknologinævnets konkurrence om det bedste bioteknologiske undervisningsmateriale.

Troels Vang Andersen, Hans Marker og Jesper B. Pedersen for gode og konstruktive ændringsforslag.

Elever fra Frederiksberg HF kursus for entusiastisk afprøvning af dette materiale.

Niels Morling, Hanna Hansen og Birthe

Eriksen alle Retsgenetisk Afd., Københavns Universitet, specielt for lån af fotos og forskningsdata.

I 1994 afholdtes den første tværfaglige og tværnationale EIBE workshop for lærere i København, hvor dele af dette materiale og laboratorieeksperimentet "*Pige myrdet efter skolefest*" blev testet. EIBE takker hermed de lærere, der deltog i denne workshop for værdifulde kommentarer. Deltagere i workshoppen var:

Fra Danmark.: Lisbet Leonard; Lene Tidemann; Mario Bro Hassenfeldt; Greta Grønqvist; Jytte Jørgensen; Tine Bing; Per Vollmond; Anker Steffensen.

Fra Irland: John Lucey; Michael O'Leary; Bruno Mulcahy; Tim O'Meara; Tom Moloney; Brendan Worsefold; Frank Killelea.

Fra Tyskland: Ulrike Schnack; Werner Bährs; Jürgen Samland; Cristel Ahlf-Christiani; Erhard Lipkow; Hubert Thoma.

Workshoppen blev ledet af : Wilbert Garvin og Jill Turner, Queen's Universitet i Belfast, UK; Dean Madden og John Schollar, NCBE, UK; og Dorte Hammelev, Frederiksberg HF kursus, Danmark.

Fra EIBE-gruppen deltog desuden: Eckhard R. Lucius, Catherine Adley og Jan Frings.

## © Copyright

Denne EIBE Unit er beskyttet af copyright. Deltagerne i udarbejdelse af denne unit har copyright under Sektion 77 af 'Copyright, design and patent Act', UK (1988).

**Til undervisningsbrug.** Der må til undervisningsbrug fremstilles elektroniske eller udskrevne kopier af denne unit. Kopierne må ikke gøres til genstand for

handel udover kopiprisen. Desuden skal ovennævnte forfattere nævnes som copyrighthavere.

**Til andre formål.** Denne unit må formidles fra person til person i ikke-kommercielt øjemed. Den må ikke formidles elektronisk via mail-server, nyhedsgrupper, bulletin boards eller uautoriserede www-forsendelser eller anden massedistribution eller på anden måde som strider imod disse restriktioner.

**Kommercielt formål.** Benyttelse af denne unit eller dele heraf i kommercielt øjemed, er strengt forbudt uden copyrighthavernes indhentede tilladelse. Ønskes hele eller dele af uniten benyttet kommercielt på nogen måde, kontakt da venligst:

EIBE Secretariat  
c/o Institut für die Pädagogik der  
Naturwissenschaften  
Universität Kiel  
Olshausenstrasse 62  
Tyskland

Tlf: +49 (0) 431 880 3137

Fax: +49 (0) 431 880 3132

Spørgsmål og kommentarer til denne unit bedes rettet til Dorte Hammelev,  
e-post: [dorte@centrum.dk](mailto:dorte@centrum.dk)

## Om dette materiale

Det foreliggende undervisningsmateriale er bearbejdet og gennemprøvet af lærere og undervisere fra forskellige europæiske lande. Arbejdet er blevet muliggjort med hjælp og støtte fra Europakommissionens DGXII under EIBE's, The European Initiative for Biotechnology Education's, auspicer.

De synspunkter der er udtrykt i dette materiale og de foreslåede aktiviteter, er forfatterens og ikke nødvendigvis EU-kommissionens.



## Sikkerhed

I EIBE's foreslåede laboratoriearbejde har vi minimeret alle synlige risikofaktorer og foreslået erstatninger for farlige stoffer og procedurer der er ufarlige (eller mindre farlige). Som et minimum overholder de god laboratoriepraksis og dansk lovgivning på dette område. Desuden henvises der til risikovejledningen.

# DNA-profilanalyse - baggrund og anvendelse



## Introduktion

Analyse af menneskers DNA finder især praktisk anvendelse inden for to områder.

1. Sundhedsvæsenet: Diagnostik af bl.a. arvelige sygdomme, kromosomfejl og cancer.
2. Retsvæsenet: Dels identifikation af personer i forbindelse med kriminalsager dels slægtskabsundersøgelse i forbindelse med faderskabs- og familiesammenføringsager.

Det er anvendelsen inden for Retsvæsenet, dvs. de såkaldt retsgenetiske DNA-analyser, der er hovedemnet for dette undervisningsmateriale.

Ved en retsgenetisk DNA-analyse undersøger man kun en meget lille del af et menneskes arvmasse. Kort fortalt går rutineanalysen ud på at bestemme længderne af 4-5 udvalgte DNA-områder på kromosomerne. Resultatet bliver en kombination af tal, der således giver et slags signalement af den pågældende person. Man kalder dette for personens DNA-profil. Analyseresultatet er af nogle blevet sammenlignet med en strekkode, og ved den først udviklede analysemetode fremstod resultatet rent faktisk også som en række sværtede "bånd" på en røntgenfilm. Man talte i den forbindelse om "Det genetiske fingeraftryk". Den metode der anvendes i dag, kaldes en DNA-profilanalyse.

## Eksempler på DNA-profil-analysernes anvendelsesområder

Aviserne bringer dagligt historier om mord og voldtægt, og DNA-profilanalyse indgår nu rutinemæssigt i opklaringen af disse sager. Det drejer sig her om at sammenligne DNA-profilerne af f.eks. blod eller sæd fra gerningsstedet med de DNA-profiler man finder hos eventuelle mistænkte i sagen.

I faderskabssager vil en sammenligning mellem moderens og barnets DNA-profiler

vise hvilken del af barnets DNA-profil der stammer fra faderen. Ved DNA-profilanalyse af en mulig far, kan man derefter afgøre om den pågældende overhovedet kan være far til barnet, altså om hans DNA-profil stemmer overens med den del af barnets profil som ikke stammer fra moderen. Tilsvarende i familiesammenføringsager. Her undersøger man f.eks. om det påståede slægtskab mellem en herboende indvandrer og en tilrejsende der ønsker permanent ophold i Danmark, kan være til stede.

Det er også muligt at identificere en afdød ved hjælp af DNA-profilanalyse, hvis den pågældende har levende slægtninge. Dette benyttes bl.a. i forbindelse med større dødsulykker såsom brandkatastrofer, f.eks. brandulykken på skibet Scandinavian Star i 1990, og flyhavarier, f.eks. et russisk flyhavari på Svalbard i 1996, hvor ofrene var blevet så medtagne, at de ikke kunne genkendes (1). Det gælder også ofre for terror (f.eks. i Israel og det tidligere Jugoslavien) og krigshandlinger (f.eks. Golfkrigen mod Irak i 1990).

Også identifikation af ældre ligrester er blevet mulig takket være udviklingen af metoder til udvinding af DNA fra især rester af skeletter, herunder tænder. Dette har muliggjort identifikation af skeletterne fra begravede personer, f.eks. mordofre og kendte enkeltpersoner som nazilægen Mengele ('bødlen fra Auschwitz') og den sidste russiske zarfamilie (2,3). I sidstnævnte tilfælde lykkedes det, ca. 75 år efter henrettelsen af familien, at fastslå hvilke af de ni skeletter man fandt i en massegrav, der stammede fra zaren, hans kone og tre af deres børn. På samme måde kunne man ved DNA-analyse fastslå at en kvinde der livet igennem havde hævdet at være zarens datter Anastasia, ikke kunne være barn af zarparret (se senere) (4).



Også inden for arkæologi og antropologi har man taget DNA-analyser i anvendelse. Et aktuelt eksempel er en opsigtsvækkende nylig analyse af DNA fra det forhistoriske menneskeskelet der blev fundet i Neandertal nær Düsseldorf i 1856, og som vurderes at være 30.000 - 100.000 år gammelt. Resultatet har sandsynliggjort at de uddøde Neandertalere og det moderne menneske, *Homo sapiens sapiens* som i en periode har levet samtidig i Europa og andre steder, er to forskellige arter hvis nedstammingslinier udskiltes fra en fælles stamform for 550.000 - 700.000 år siden (5). DNA-analyser anvendes også i studier af andre organismer, f.eks. virus og bakterier samt planter og dyr, både i forskningssammenhæng (f.eks. afklaring af nærmere eller fjernere slægtskab mellem arter) og mere praktisk, f.eks. i forbindelse med diagnostik af infektions-sygdomme, ved opklaring af tyveri samt illegale transporter af dyr og til kontrol af gensplejsede planter.

### **Menneskets arvemasse**

Langt det meste af et menneskes arvemasse, eller genom, findes i cellernes kerne (kerne-DNA); men en lille, både vigtig og interessant del findes i mitokondrierne (mitokondrie-DNA) og vil blive omtalt særskilt.

### **Kerne-DNA**

Kerne-DNA'et er hos mennesket fordelt på 46 lange molekyler der danner 'den genetiske ryggrad' i hvert sit kromosom. De 46 kromosomer forekommer parvis, og for hvert par gælder det, at man har arvet det ene kromosom fra sin mor og det andet fra sin far. Dette er baggrunden for den klassiske arvelov (Mendels 1. lov) og for at DNA-analyser kan belyse slægtskabsforholdene inden for en familie, herunder klarlægge nedarvningsmønstret for sygdomsgener.

Kromosomerne i det ene af de 23 par kaldes kønskromosomer, fordi dette par er forskelligt hos de to køn: to X-kromosomer (XX) hos piger/kvinder og et X- og et Y-kromosom (XY) hos drenge/mænd. Y-

kromosomet er meget forskelligt fra X-kromosomet, og det er et bestemt gen på Y-kromosomet der grundlæggende bestemmer at det pågældende individ bliver hankøn. Analyse af blodspor og vævsrester for Y-kromosomspecifikt DNA kan derfor bruges til bestemmelse af ophavspersonens køn. Kromosomerne i de resterende 22 par kaldes autosomer.

Det anslås at menneskets genom indeholder 50.000-100.000 gener, hvis funktion er at kode for organismens mange forskellige proteiner. Langt størstedelen af genomet består imidlertid af ikkekodende DNA-sekvenser som er beliggende enten inde i generne - i form af de såkaldte introner - eller mellem generne. Det er i de ikke-kodende sekvenser, man finder de områder der undersøges i de retsgenetiske DNA-profilanalyser. På grund af genomets størrelse og variation har ethvert menneske, bortset fra énæggede flerlinger (tvillinger, trillinger mv.), en unik sammensætning af kerne-DNA'et.

### **Mutationer**

DNA er stabilt, men ikke statisk. Der sker med mellemrum springvise ændringer (mutationer) i DNA, dvs. at rækkefølgen (sekvensen) af basepar ændres i et givet område af genomet. En mutation kan have alvorlige følger hvis den medfører ændring i syntese eller funktion af et vigtigt protein i cellen/organismen. De fleste mutationer er imidlertid uden konsekvenser for organismen, typisk fordi de finder sted i ikkekodende sekvenser enten i eller uden for et gen. Det er sådanne uskadelige, neutrale mutationer, der er baggrunden for de fleste forskelle mellem folks genomer.

### **Særligt variable områder**

Ved den rutinemæssige, retsgenetiske DNA-profilanalyse undersøger man nogle bestemte områder af genomet hvor en sekvens af basepar er gentaget et større eller mindre antal gange i direkte forlængelse af hinanden, *se figur 1*.

**Figur 1. En skitse af et VNTR-område i et bestemt kromosompar hos en person.** De to kromosomer har henholdsvis 10 og 18 gentagelser af den pågældende sekvens.

kromosom fra faderen:



kromosom fra moderen:



På engelsk, og i dansk genetisk fagsprog, benævnes en gentaget sekvens et *repeat*, og de områder af kerne-DNA'et, hvor der forekommer en sådan variation af et antal gentagelser, betegnes VNTR-områder (VNTR er en forkortelse af det engelske udtryk *variable number of tandem repeats*, dvs. et variende antal gentagne sekvenser lige efter hinanden). Et givet VNTR-område på et bestemt kromosom vil således have en længde, der afhænger af hvor mange basepar der er i den gentagne sekvens, og hvor mange gentagelser der er tale om, *figur 1*.

Ved en DNA-profilanalyse bestemmer man længderne af et antal forskellige VNTR-områder, og DNA-profilen angives som en simpel kombination af de fundne størrelser udtrykt på en internationalt vedtaget måde.

### Opdagelsen af VNTR-områderne

Opdagelser af disse særlige områder i genomet skyldes professor Alec Jeffreys og hans forskergruppe på universitetet i Leicester, UK. De arbejdede med kortlægning af genet for myoglobin, det røde, iltbindende protein i muskler. Under dette arbejde opdagede de, at der i en af genets introner er en sekvens af basepar der er gentaget flere gange i forlængelse af hinanden, og at antallet af gentagelser kan variere fra det ene myoglobin-gen til det andet og dermed fra person til person. Jeffreys og hans gruppe ville bruge dette områdes særlige karakter til at finde ud af hvilket kromosom myoglobin-genet sidder på. De isolerede derfor DNA fra det pågældende område for at bruge det som probe (fra engelsk *probe*, dansk sonde) i DNA-analyser.

En probe er et DNA-molekyle, hvis strenge kan baseparre med DNA-strengene i det område man er interesseret i at undersøge. Proben mærkes enten kemisk eller radioaktivt, så den senere kan spores, f.eks. ved hjælp af en fotografisk film.

Da Jeffreys og hans medarbejdere efterfølgende anvendte proben i de planlagte DNA-analyser, opdagede de til deres overraskelse, at hver analyseret prøve resulterede i talrige 'bånd' på den fotografiske film, som udtryk for at proben havde bundet sig til et stort antal DNA-områder hos hver person. Båndmønsteret viste sig at være meget personspecifikt, og 'det genetiske fingeraftryk' var opfundet. Senere blev de forskellige VNTR-områder som lå bag de mange bånd identificeret og karakteriseret, og det blev muligt at analysere dem hver for sig hvilket er det princip man bygger på i den moderne DNA-profilanalyse.

Jeffreys har høstet megen anerkendelse, inklusive en adelstitel, for sin opdagelse, og metodeudvikling på dette område, hvorved han har lagt grunden til de retsgenetiske DNA-analyser. Hans arbejde er et af mange

**Figur 2. Sir Alec Jeffreys**





## Mere om VNTR-områder

Mange af de først opdagede VNTR-områder havde adskillige basepar (typisk 20-50) per gentaget sekvens, og en variation i antallet af gentagelser på fra f.eks. 50 til mange hundrede. Et sådant VNTR-område kan således variere fra 1.000 til 10.000 basepar eller mere. Antallet af gentagelser af en given sekvens, og dermed længden af det pågældende VNTR-område, nedarves efter Mendels 1. lov. Derfor taler man i genetisk sprogbrug om et VNTR-locus med forskellige alleller, hver karakteriseret ved en bestemt længde. Et sådant locus med flere alleller siges at udgøre en genetisk polymorfi (polymorfi = forekomst af mange former; her: mange udgaver). I analysen af et VNTR-område betegnes dette også som et VNTR-system.

I et højvariabelt VNTR-locus vil over 95 % af individerne i en given befolkning have alleller af forskellig længde og dermed være heterozygot på dette locus. Sandsynligheden for at to ubeslægtede personer vil have samme allelkombination på et givet VNTR-locus vil ofte være meget mindre end 1 %.

De senere år har man opdaget eksistensen af et meget stort antal VNTR-områder med kun 2-4 basepar per gentaget sekvens, og hvor antallet af gentagelser ikke varierer mere end fra f.eks. 5 til 15. Det er nogle af disse såkaldte STR-områder (*short tandem repeats*) der undersøges i nutidens avancerede retsgenetiske DNA-profilanalyser. *Se figur 11.*

eksempler på en vigtig opdagelse, der er gjort i forbindelse med en undersøgelse med et helt andet formål. Samtidig er det et eksempel på at man gennem grundforskning kan opnå viden der hurtigt kan omsættes til værdifuld praktisk anvendelse.

### Mitokondrie-DNA

Mitokondrie-DNA (mtDNA) er et lille, ringsluttet DNA-molekyle med knap 16.600 basepar. (Til sammenligning anslås DNA'et i cellekernens 46 kromosomer at indeholde i alt ca. 6 milliarder basepar, svarende til knap to meter DNA!). Da hvert mitokondrie indeholder 5-10 mtDNA-molekyler, og en celle kan indeholde i hundred- eller tusindvis af mitokondrier, vil en persons celler typisk indeholde i tusindvis af mtDNA-molekyler som ydermere normalt alle har samme sekvens af basepar. Dette store antal kopier per celle gør at mtDNA er den del af genomet der bevares længst i analysérbar tilstand efter døden eller i biologisk spormateriale.

På grund af beliggenheden uden for cellekernen nedarves mtDNA udelukkende gennem kvinder (sædcellen bidrager kun med kerne-DNA). Det betyder, at en kvinde og hendes børn, mor, mormor samt øvrige

familiemedlemmer der er beslægtet gennem samme, ubrudte kvindelinie, har samme mtDNA-sekvens. En analyse heraf muliggør derfor fastlæggelse af slægtskabsforhold selv på mange generationers afstand, for så vidt der er tale om slægtskab gennem en ubrudt kvindelinie.

Der sker dog selvfølgelig også lejlighedsvis mutationer i mtDNA, og per basepar sker det med større hyppighed i mtDNA end i kerne-DNA. Dette skyldes at mtDNA er mindre beskyttet mod beskadigelser end kerne-DNA, og at mitokondrierne ikke har et DNA-reparationssystem, sådan som cellekernen har. Der er derfor i årtusindernes løb opstået en betydelig variation i menneskehedens mtDNA-sekvenser. Ca. halvdelen af variationen forekommer i to mindre, ikkekodende områder af mtDNA-molekylet, og kortlægning af sekvensen i disse højvariable områder er blevet et vigtigt redskab i både retsgenetiske og antropologiske undersøgelser. Det var således mtDNA-analyser der gjorde det muligt at identificere skeletterne af den sidste russiske zar og hans familie (2,3), herunder afsløre 'den falske Anastasia' (4), og at få de første genetiske oplysninger om Neandertal-mennesket (5).

# Undersøgelseteknikker



## DNA-profil-analysens praktiske udførelse

I det følgende vil de to former for DNA-profil-analyse, den klassiske og den moderne, blive gennemgået. Da man i begge former anvender elektroforese til karakterisering af de alleler der analyseres for, vil dette princip blive beskrevet først.

### Elektroforese

Elektroforese betyder vandring i et elektrisk felt. Da DNA-molekyler indeholder mange fosforsyregrupper, er de negativt ladede i basisk opløsning. I et elektrisk felt vil de derfor 'vandre' mod den positive pol, anoden. Hvis denne vandring foregår i en gel, vil der samtidig ske en sortering af DNA-molekylerne efter størrelse, fordi små molekyler slipper hurtigere gennem gelsens molekyllære netværk end store. Gel-elektroforese er en enkel og uhyre nyttig metode til adskillelse af DNA-molekyler efter størrelse, og den benyttes ved talrige former for DNA-analyse.

## Metode 1

### Klassisk DNA-profilanalyse

Den klassiske DNA-profilanalyse, hvor man undersøger større VNTR-områder, foregår som en såkaldt RFLP-analyse. (Se hvordan en RFLP-analyse gennemføres på siderne 12 og 13). RFLP er en forkortelse af det engelske udtryk *restriction fragment length polymorphism* (dansk: restriktions-fragment-længde-polymorfi). Baggrunden for dette udtryk er en opdagelse, der blev gjort i 1970'erne: Når DNA fra f.eks. et menneske behandles med et såkaldt restriktionsenzym (se nedenfor), 'klipper' enzymet DNA-molekylerne i mindre stykker som derfor kaldes restriktions-fragmenter.

For et bestemt VNTR-område vil en persons DNA som regel vise sig at give to restriktionsfragmenter af hver sin længde, hvor det ene stammer fra det kromosom der er arvet fra moderen, det andet fra det der er arvet fra faderen (se Figur 3).

**Figur 3.** De to VNTR-alleler fra figur 1, her med pile der angiver de steder hvor et bestemt restriktionsenzym klipper på hver sin side af VNTR-området. Afstandene mellem pilene anskueliggør længderne af de tilsvarende restriktionsfragmenter der indeholder VNTR-området.

kromosom fra faderen



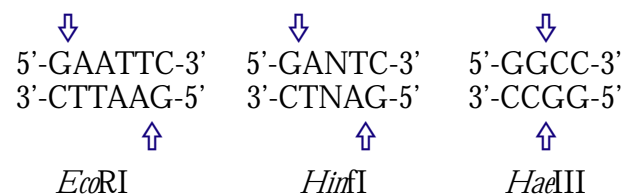
kromosom fra moderen



Som tidligere nævnt er et VNTR-locus og dets alleler et eksempel på en såkaldt genetisk polymorfi. Da denne polymorfi i den klassiske DNA-profilanalyse karakteriseres ved variationen af de pågældende restriktionsfragmenters længde, har den fået betegnelsen *restriktionsfragmentlængdepolymorfi* (RFLP).

### Restriktionsenzym - grundlæggende redskaber i klassisk DNA-analyse

Restriktionsenzym er en bestemt slags enzymer, man har fundet hos bakterier. De har den egenskab at kunne genkende en sekvens af sædvanligvis 4-6 basepar i et DNA-molekyle og 'klippe' de to DNA-strenger over, enten i eller nær ved denne genkendelsessekvens (se Figur 4). Ved hjælp af restriktionsenzym kan man således 'klippe' lange DNA-molekyler i stykker på en veldefineret og gentagelig måde. Som



**Figur 4.** Eksempler på restriktionsenzymers genkendelsessekvenser og 'klippemønstre'. 5'- og 3'- angiver DNA-strengens orientering. Når en DNA-streng opbygges sker det ved trinvis påhæftning af nukleotider i 3'-enden, dvs. at syntesen sker i retningen 5' til 3'. Det midterste basepar i genkendelsessekvensen for *HinfI* (NN) kan være et hvilket som helst af de fire mulige. Enzymernes genkendelsessekvenser er, som her, oftest symmetriske, dvs. ens på de to strenger.

## Mere om restriktionsenzymmer

Restriktionsenzymmerne indgår i bakteriernes forsvarssystem mod bakterievirus (bakteriofager). De kan 'klippe' indtrængende virus-DNA i stykker og således uskadeliggøre det. Derved er de med til at begrænse antallet af virusarter som kan inficere den pågældende bakterie, og det er det der har givet enzymernes deres navn (*restriktion* = begrænsning). (Bakterierne beskytter deres eget DNA mod restriktionsenzymet ved at sætte en methylgruppe på en af baserne, dér hvor restriktionsenzymets genkendelsessekvens forekommer. Dette forhindrer restriktionsenzymet i at genkende sekvensen.)

Der kendes nu mange hundrede forskellige restriktionsenzymmer med hver deres genkendelsessekvens, og de kan købes gennem de mange firmaer som forhandler molekylærbiologiske reagenser. Enzymerne betegnes med kursiverede trebogstavforkortelser af navnet på den bakterieart, de oprindeligt er fundet hos; f.eks. er enzymet *EcoRI* (udtales 'Ekko er ét') oprindeligt fundet hos kolibakterien *Escherichia coli*, bedre kendt som *E. coli*. I europæisk retsgenetik bruges restriktionsenzymet *HinfI*; oprindeligt fundet hos bakterien *Haemophilus influenzae*, mens man i USA bruger enzymet *HaeII* der stammer fra bakterien *Haemophilus aegypti*.

biokemiske redskaber er restriktionsenzymmer af fundamental betydning i både genteknologi og DNA-analyse. (Se kassen *Mere om restriktionsenzymmer* og læs evt. også om dem i din genetik-lærebog eller i *Eksperimentel Genteknologi*.)

## Flere forskellige VNTR-områder analyseres på samme nylon-membran

Når man har sikret sig, at båndmønstret på den fremkaldte film er af god kvalitet, fjerner man den mærkede probe fra nylonmembranen, f.eks. ved kogning. Dette ændrer ikke mønstret af de bundne enkeltstrengede restriktionsfragmenter, og man kan derfor gentage trinene 5-7 med en ny probe, der kan binde sig til fragmenterne fra et af de andre VNTR-områder. Således bruger man den samme nylonmembran til analyse af alle de 4-5 VNTR-systemer der indgår i den DNA-profilanalyse, man foretager. Det er naturligvis en stor praktisk og sikkerhedsmæssig fordel, at man kan bruge én og samme elektroforese til at analysere alle systemerne med.

## Fordele og begrænsninger ved RFLP-analyse

Den største fordel ved en RFLP-baseret DNA-profilanalyse er den meget store længdevariation der findes i de klassiske VNTR-områder, eller sagt med andre ord: det store antal alleller på hvert af disse loci. Det giver en meget høj sandsynlighed for, at DNA-profilerne af prøver der stammer fra forskellige personer, er klart forskellige. Samtidig indebærer det imidlertid også en metodemæssig svaghed, idet de forskellige allellers restriktions-

fragmenter er så store, at deres længde ikke kan bestemmes ret præcist. Elektroforesen vil vise en glidende overgang mellem længderne af forskellige alleller. Det vanskeliggør sammenligningen mellem ensartede fragmentstørrelser i to forskellige prøver, ikke mindst hvis prøverne er blevet analyseret på hver sin gel. For selv om to geler bliver behandlet på samme måde, så kan elektroforeser i to forskellige apparater, eller i samme apparat på to forskellige tidspunkter, godt falde lidt forskelligt ud.

En RFLP-baseret DNA-profilanalyse kræver minimum 20 nanogram forholdsvis intakt DNA for at kunne lykkes. Dette sætter visse begrænsninger for metodens anvendelse i kriminalsager, hvor man som udgangsmateriale kan have meget lidt og meget nedbrudt DNA i ekstrakter fra f.eks. blod- og sædpletter. Ydermere kan der opstå vanskeligheder hvis der er fremmede stoffer til stede i ekstrakterne. Farvestoffer i tøj, f.eks. cowboybukser, kan påvirke DNA-fragmenternes vandring under elektroforesen og dermed give anledning til forkerte fortolkninger af analyseresultaterne. Resultatet af denne påvirkning kan så blive, at fragmenternes længder bestemmes til at være anderledes end dem der findes ved analyse af en blodprøve udtaget fra den person pletterne stammer fra. Herved vil man umiddelbart vil kunne komme til at udelukke den pågældende som ophavsperson til disse. En systematisk påvirkning der berører alle undersøgte systemer vil dog vække mistanke om at der er noget galt.

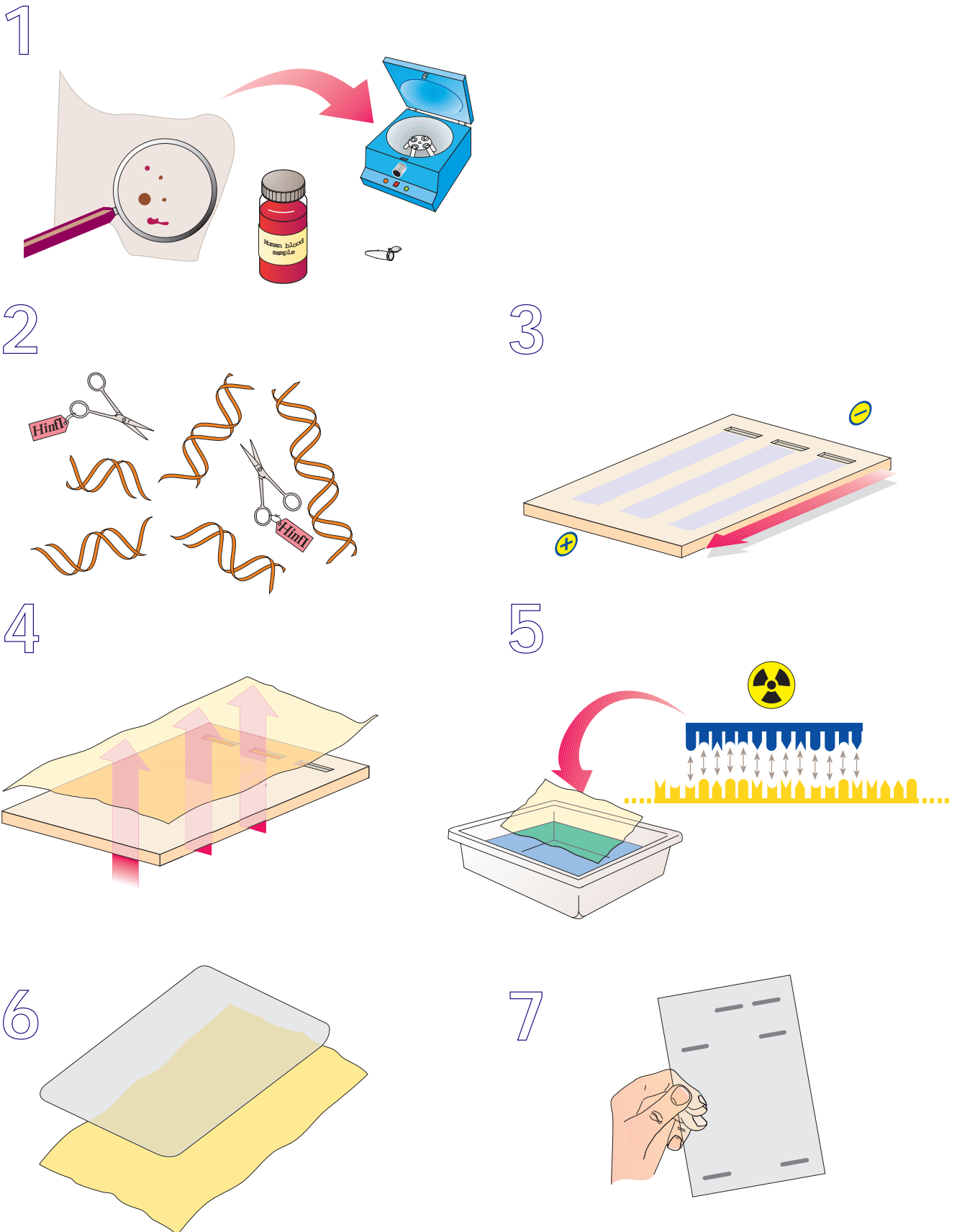
# Skematisk gennemgang



## af en RFLP-analyses forskellige trin

- 1 En (blod)prøve modtages. DNA'et udvindes og oprenses. I en blodprøve er det kun de hvide blodlegemer der indeholder både kerne-DNA og mtDNA. (Hos pattedyr, inklusive mennesket, indeholder de røde blodlegemer ikke DNA. Blodplader indeholder kun mtDNA).
- 2 DNA'et behandles med restriktionsenzymet *Hinf*I der bl.a. klipper på begge sider af de VNTR-områder der skal analyseres (jf. Fig. 3).
- 3 Opløsningen med restriktionsfragmenterne pipetteres ned i brøndene i en agarosegel som er nedsænket i en basisk buffer i et elektroforeseapparat, og elektroforesen sættes i gang.
- 4 Elektroforesen afsluttes, gelen tages op af elektroforeseapparatet, og de størrelsessorterede DNA-fragmenter overføres til en nylonmembran der efter elektroforesens afslutning er blevet placeret oven på agarosegelen sammen med et godt lag væskesugende papir. Denne metode kaldes *Southern blotting* efter den biokemiker (Ed Southern) som opfandt den. Inden, eller under, overførslen behandles agarosegelen med en stærkt basisk væske (NaOH) for at denaturere DNA-fragmenterne, dvs. bryde baseparrenes hydrogenbindinger, så fragmenterne bliver enkeltstrengede og bindes som sådanne til nylonmembranen.
- 5 Nylonmembranen med de bundne, enkeltstrengede DNA-fragmenter bades i en opløsning der indeholder en denatureret DNA-probe med en basesekvens som modsvarer en del af sekvensen på fragmenterne med det VNTR-område der skal analyseres. Probestrengene bindes herunder til de pågældende enkeltstrengede fragmenter ved baseparring.
- 6 Nylonmembranen tages op, overskydende - dvs. ubundet - probe skylles af, og membranen tørres. Derefter lægges den på en følsom fotografisk film så man kan få fundet de steder på membranen hvor proben sidder.
- 7 Den fotografiske film fremkaldes, og de 'bånd' der svarer til de søgte restriktionsfragmenter kan nu ses. Derefter kan fragmenternes størrelse fastlægges ud fra den længde de har vandret i agarosegelen, idet man sammenligner med vandringen af DNA-molekyler af kendt størrelse, en såkaldt markør, som har 'kørt med' på gelen i en bane for sig (ikke med på figuren).

Figur 5. Skitse-mæssig gennemgang af en RFLP-analyses forskellige trin



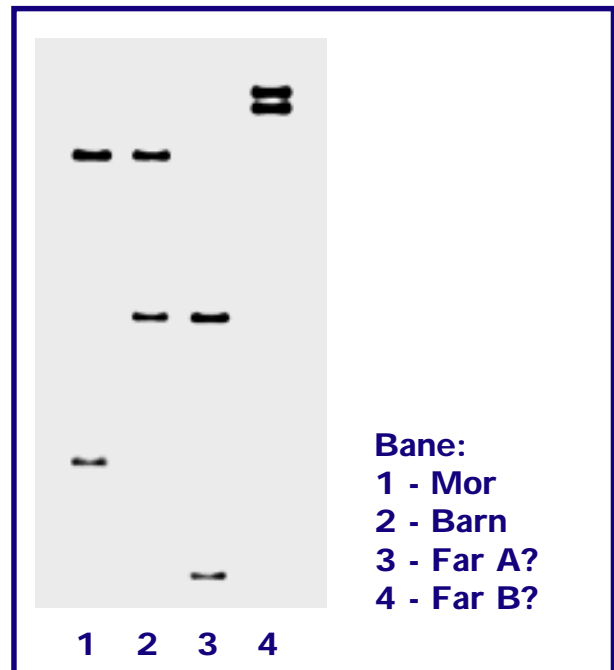
# Eksempler på konkrete sager

## Opgave 1: En faderskabssag

Figur 6 viser resultatet af en RFLP-baseret DNA-profilanalyse fra en faderskabssag. I tolkningen af dette resultat skal man huske det genetiske grundlag: Der er tale om et VNTR-locus hvor hver person har to alleller, den ene arvet fra moderen den anden fra faderen.

- I den foreliggende sag er der udlagt to mulige fædre. Hvilket af følgende to spørgsmål giver analysen bedst svar på ud fra de foreliggende analyseresultater? (Begrund dit svar.)
  - Hvem af de to er far til barnet?
  - Hvem af de to kan ikke være far til barnet?
- Hvorfor analyserer man rutinemæssigt helt op til fem VNTR-områder i faderskabssager? (Begrund dit svar.)

Figur 6.

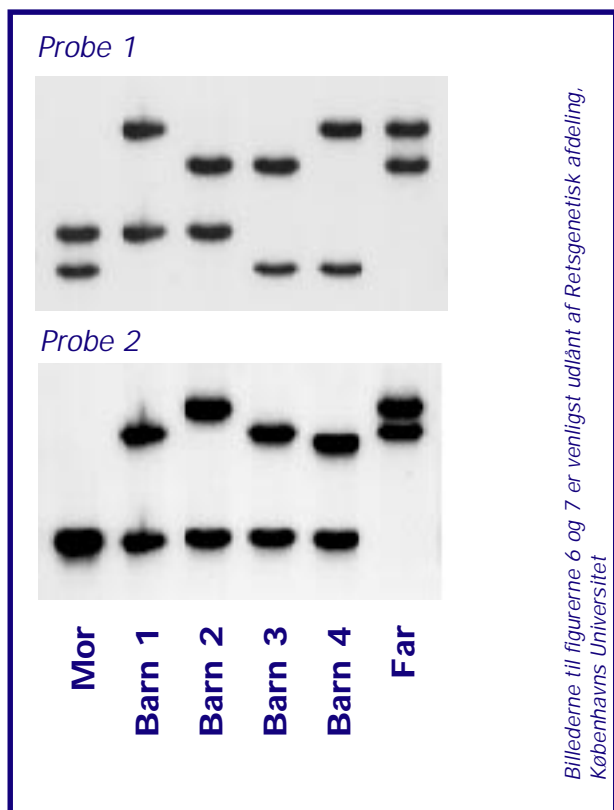


## Opgave 2: En familiesammenførings sag

Figur 7 viser resultatet af en DNA-profilanalyse af en familie, hvor man har analyseret to forskellige VNTR-områder. Historien er den at en flygtningefamilie med tre børn har fået opholdstilladelse i Danmark. Nogen tid efter ankommer en stor dreng til landet som flygtning. Både han og familien siger at han er familiens fjerde barn, og han ønsker at slutte sig til resten af familien i henhold til lov om familiesammenføring. Myndighederne ønsker derfor familieskabet belyst ved en DNA-profilanalyse.

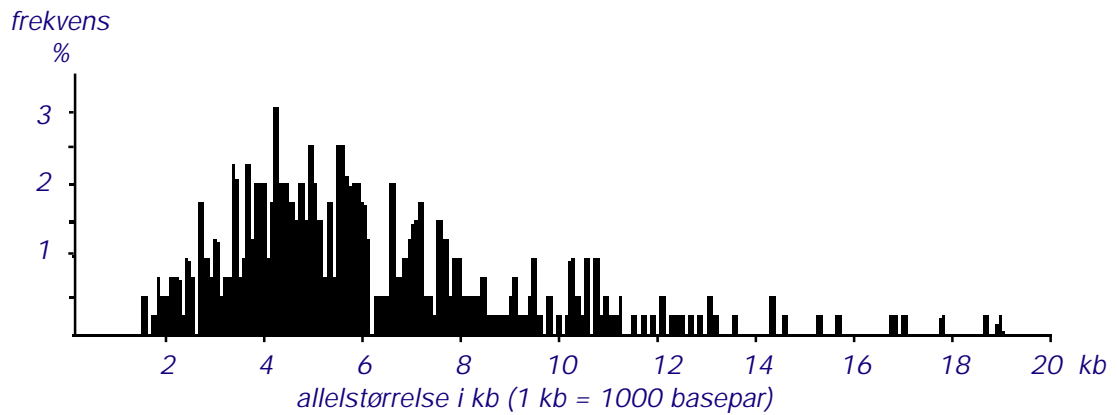
- Kan de to voksne efter det foreliggende være forældre til børnene 1, 2 og 3? (Begrund dit svar.)
- Kan de to voksne efter det foreliggende være forældre til barn 4? (Begrund dit svar.)
- Forklar, med udgangspunkt i dine svar, om du synes at barn 4 skal have opholdstilladelse i landet og slutte sig til den pågældende familie. (Se også diskussionsspørgsmålene side 24.)

Figur 7.



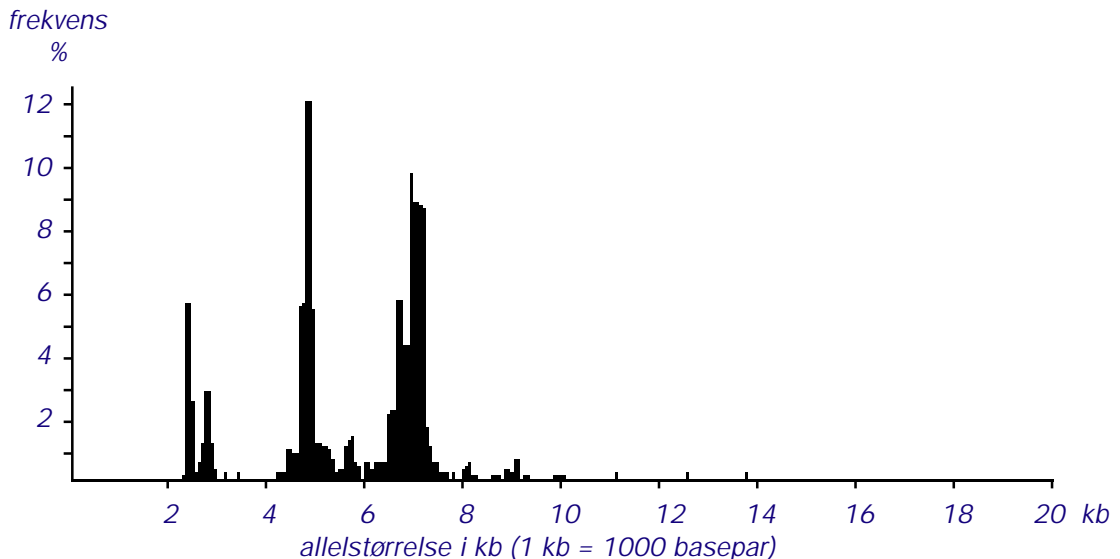


**Figur 8. VNTR-locus D1S7 (probe: MS1).**



X-aksen viser størrelsen af de forskellige alleler; Y-aksen viser allelhyppigheden i % af det undersøgte antal alleler. Den gentagne sekvens er på 9 basepar. De mindste alleler har lidt over 130 gentagelser, de største over 2000. Mutationsraten for dette locus er ca. 5 % hvilket er relativt højt selv for et VNTR-område. D1S7 ligger på den lange arm af kromosom 1. (Kilde: Cellmark salgskatalog)

**Figur 9. VNTR-locus D5S43 (probe: MS8).**



X-aksen viser størrelsen af de forskellige alleler; Y-aksen viser allelhyppigheden i % af det undersøgte antal alleler. Den gentagne sekvens er på 30 basepar. De mindste alleler har ca. 80 gentagelser, de største flere hundrede. (Kilde: Cellmark salgskatalog)

### **Opgave 3: To VNTR-loci; D1S7 og D5S43**

Figurerne 8 og 9 viser allelfordelingerne inden for de to VNTR-loci D1S7 og D5S43 i en europæisk befolkningsgruppe.

1. Beskriv i ord hvad hver graf viser.
2. Angiv for hvert af de to loci hvilken allel der er den hyppigste.
3. Er de to VNTR-områder lige anvendelige til undersøgelser af en mordsag, en faderskabssag og en familiesammenførings sag? (Begrund dit svar.)

# Metode 2: Moderne DNA-profilanalyse



Som tidligere nævnt drejer denne form for DNA-profilanalyse sig om analyse af STR-områder (*short tandem repeats*). Forud for analysen af længderne af disse loci alleler, opformeres de enkelte STR-områder ved anvendelse af PCR-teknik (*polymerase chain reaction*, dansk: polymerasekædereaktion). Det er en meget effektiv metode til opformering af DNA. Under passende omstændigheder kan man med denne teknik i løbet af nogle få timer producere flere millioner kopier af et bestemt stykke DNA.

For at opnå denne opformering blander man i et reagensglas bl.a. følgende: DNA fra den prøve der skal analyseres, DNA-polymerase (et enzym der syntetiserer kopier af allerede eksisterende DNA), de fire deoxynukleosidtrifosfater som er 'byggestenene' til det DNA der skal syntetiseres under kædereaktionen. Desuden kræves to mindre, enkeltstrengede DNA-molekyler, typisk 20-30 nukleotider lange, som kan baseparre med hver sin streng på hver sin side af det område, man ønsker opformeret (figur 10). Da disse to korte DNA-streng (oligonukleotider) udgør startpunkterne for

DNA-polymerasens opformering af DNA, har de fået betegnelsen *primere* (udtales "prajmere") som er den engelske betegnelse for startmolekyler i en polymerisering.

PCR-opformering af DNA består af flg. principielle trin, der gentages cyklisk 25-35 gange efter behov (Figur 10).

## A. Forberedelse til udførelse af PCR

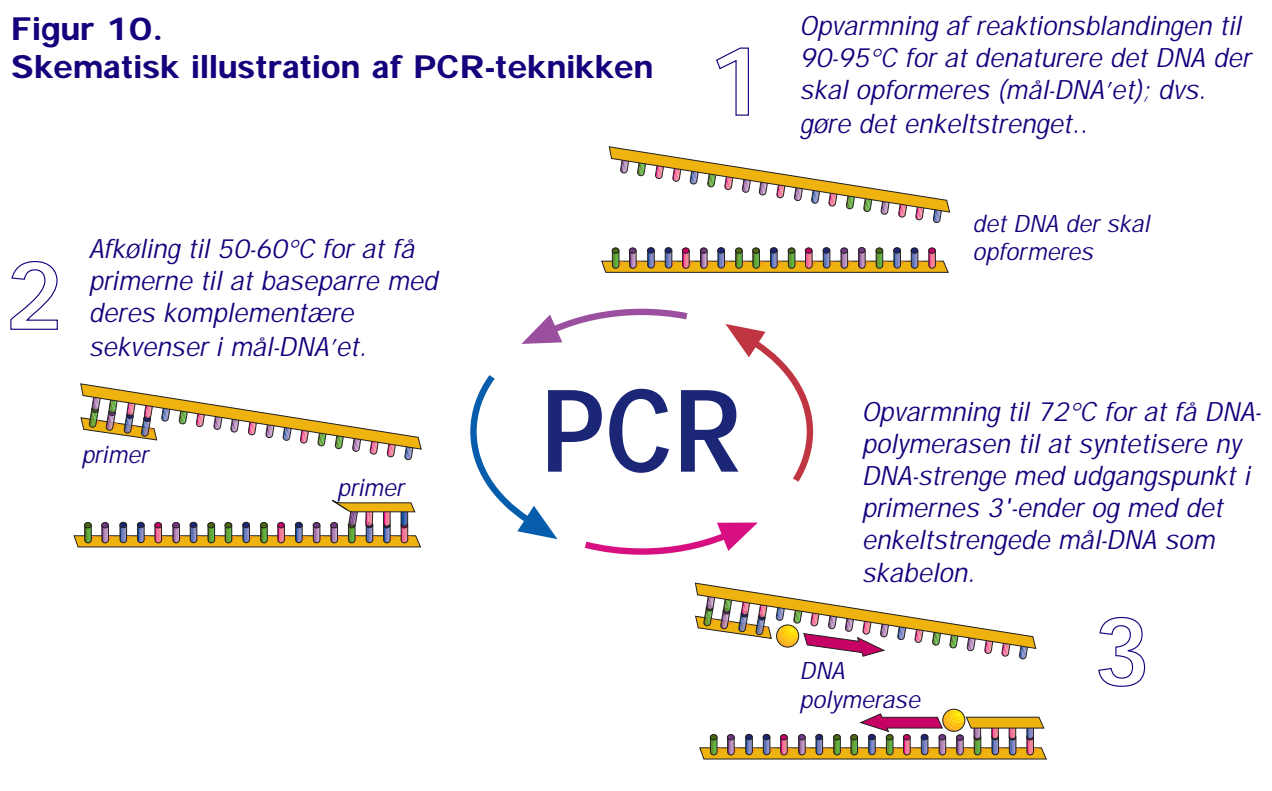
Der indkøbes, eller fremstilles, to primere som passer til hver sin streng på hver sin side af det DNA-område, der ønskes opformeret.

DNA oprenses fra den prøve der skal analyseres. Udgangsmaterialet kan f.eks. være en blodprøve, celler fra mundslimhinden (fås ved en simpel mundskylning eller et let skrab med en spatel), hår eller blod- og sædpletter. (Under passende omstændigheder kan det lade sig gøre at udføre PCR-opformering ud fra uoprenset DNA, f.eks. fra en dråbe fuldblod.)

## B. Reaktionsblandingen tilberedes.

Til en passende mængde af DNA-prøven sættes de to primere, de fire

**Figur 10.**  
**Skematisk illustration af PCR-teknikken**



deoxynukleosidtrifosfater (dATP, dGTP, dCTP og dTTP), reaktionsbuffer og DNA-polymerase.

### C. Reaktionen udføres på en PCR-maskine.

En PCR-maskine programmeres til de tre temperaturtrin som skal muliggøre henholdsvis denaturering af DNA'et, binding af primerne til det enkeltstrengede DNA og syntese af ny DNA-streng med primernes 3'-ender som startpunkter. Endvidere programmeres den til at udføre det ønskede antal gentagelser af det cykliske forløb gennem de tre temperaturtrin. PCR-maskinen startes. En cyklus bestående af de tre temperaturtrin vil normalt tage 3-4 min og i princippet resultere i en fordobling af mængden af det ønskede DNA. Dvs. at man efter f.eks. 30 cykler, i alt ca. to timer, vil kunne

have fået produceret flere millioner kopier af det ønskede DNA.

### D. Analyse af det opformerede DNA.

De opformerede STR-alleler størrelsesbestemmes ved elektroforese. Dette sker nu om dage på et sofistikeret elektroforeseapparat, der er koblet til en computer mv. som automatisk analyserer PCR-produkternes vandring i forhold til det markør-DNA af kendt størrelse, som 'kører med' på gelen. Figur 11 viser en sådan computerudskrift.

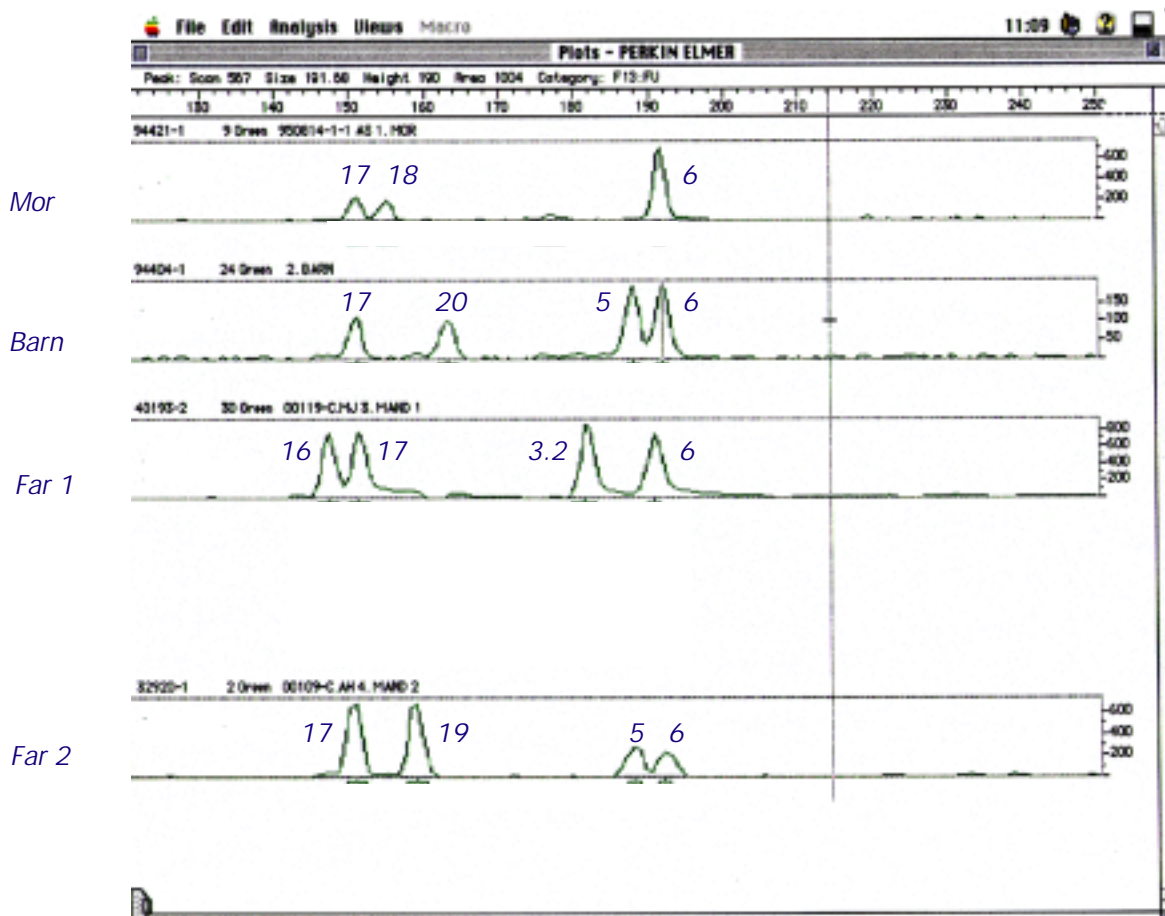
### Opgave 4

Diskutér resultatet af analysen og giv jeres vurdering af udfaldet af det retlige efterspil.

## Figur 11. Computerudskrift af en PCR-baseret DNA-profilanalyse i en faderskabssag

De to analyserede loci er henholdsvis HUMvWA (med 5 forskellige alleler: 16, 17, 18, 19 og 20) og HUMF13 (med 3 alleler: 3.2, 5 og 6). Hver top repræsenterer en allel, og nummeret angiver antallet af gentagelser. Allellen 3.2 forekommer med en hyppighed på godt 10% i den danske befolkning. Den består af 3 gentagelser + to ekstra basepar.

Primerne er valgt, så hvert af de opformerede DNA-stykker (PCR-produkterne) er af en karakteristisk størrelse. Så kan flere loci analyseres i samme reaktion uden overlap. Det forklarer hvorfor allellerne fra det mindre HUMF13 locus (med 3-6 gentagelser) i den foreliggende analyse er repræsenteret ved større PCR-produkter end HUMvWA allellerne (med 16 - 20 gentagelser).



## Fordele og begrænsninger ved PCR

PCR-teknikken har revolutioneret alle former for DNA-analyse, og de PCR-baserede DNA-profilanalyser er ved at udkonkurrere RFLP-analyserne. Det er fordi de er hurtigere og mindre arbejdskrævende, bl.a. kan mange af arbejdsstrinene automatiseres, og fordi der i én og samme reaktion kan opformeres DNA fra 4-6, eller flere, forskellige STR-områder.

Brugen af PCR-teknik gør også at analyserne kan gennemføres ud fra meget lidt DNA. Hvor der til en RFLP-baseret DNA-profilanalyse skal anvendes mindst 20 nanogram intakt DNA som udgangsmateriale, kan man til en PCR-baseret analyse rutinemæssigt nøjes med ca. 1 nanogram, ja i princippet med DNA fra én enkelt celle, dvs. ca. 10 picogram DNA (9). Derfor er PCR-baseret DNA-profilanalyse særlig velegnet i kriminalsager, hvor en enkelt blodplet på offerets tøj eller nogle få hår på gerningsstedet kan være det eneste spor af voldsmanden. Ydermere kan DNA'et i sådanne tilfælde være meget nedbrudt, så det kun er muligt at analysere netop STR-områderne og kun efter opformering. Hvis der er meget lidt DNA til stede, f.eks. meget få celler som udgangsmateriale, er der imidlertid risiko for at opformeringen af nogle af STR-allelerne svigter (*allele dropout*) (9).

Ukendte sporstoffer i ekstrakter fra f.eks. blodpletter kan virke hæmmende på DNA-polymerasen og derfor give vanskeligheder med opformeringen. I kriminalsager kan der derfor ofte ligge et stort arbejde med at oprense DNA'et tilstrækkeligt før en PCR-opformering kan lykkes.

PCR-teknikkens store følsomhed er imidlertid også dens største svaghed idet tilblending af DNA fra en anden person vil kunne give anledning til alvorlige fejlslutninger ud fra resultaterne. Derfor har laboratorier der arbejder med PCR-opformering ud fra små mængder udgangsmateriale, måttet skærpe kravene til håndteringen af prøverne og indretningen af laboratorierne.

Risikoen for 'forurening' af prøverne med andet DNA, f.eks. fra det personale der håndterer dem, skal være minimal. Opformeret DNA fra andre prøver er en anden oplagt forureningskilde. I retsgenetiske laboratorier er der derfor en klar fysisk adskillelse mellem de laboratorier hvor DNA'et oprenses, og PCR-opformeringen forberedes, og dem hvor selve opformeringen og den efterfølgende analyse sker. Samtidig er man meget påpasselig med at destruere overskydende opformeret DNA og minimere muligheden for at det slipper ud fra de rum hvor der arbejdes med det.

## PCR-teknikkens opfindelse og udvikling

Den første internationale artikel der beskrev PCR-teknikken blev publiceret i 1985 (6); men metoden fik først sin store anvendelighed og udbredelse i 1988 da man fik udvundet en varmemestabil DNA-polymerase og automatiseret processen (7). Den udføres nu på en computerstyret varmeblok, kaldet en PCR-maskine eller et PCR-apparat, og der findes mange forskellige fabrikater heraf på markedet nu om dage. Tilsvarende har man også fundet, og senere genteknologisk modificeret, en række forskellige varmemestabile DNA-polymeraser. Den første og fortsat mest anvendte hedder *Taq-polymerase*, idet den er fundet hos bakterien *Thermus aquaticus* der lever i varme kilder. Disse enzymer tåler de gentagne opvarmninger til op over 90°C, så det ikke er nødvendigt at sætte yderligere enzym til under reaktionen. Det måtte man gøre igen og igen i begyndelsen, hvor man brugte en varmefølsom DNA-polymerase fra *E. coli*.

PCR-teknikken er opfundet af amerikaneren Kary Mullis som fik ideen i 1983 under en køretur i bjergene på vej til sit sommerhus i Californien (8). Mullis fik en bonus på 10.000 \$ af det firma han var ansat i. Firmaet solgte siden patentrettighederne for 300 millioner \$. Kary Mullis fik i 1993 Nobelprisen i kemi for sin opfindelse.

## Anvendelse i praksis

Af indlysende grunde søger de forskellige retsgenetiske laboratorier så vidt muligt at blive enige om at analysere de samme VNTR-områder. Inden man bestemmer sig for hvilke områder man vil anvende, foretager man en kortlægning af de pågældende loci med hensyn til hvilke alleler der forekommer i de forskellige befolkninger - og med hvilke hyppigheder - samt af deres mutationsrater. Dette er en nødvendig forudsætning for en vurdering af områdernes anvendelighed i kriminalsager henholdsvis slægtskabsundersøgelser. Figureerne 8 og 9 viser eksempler på allelfordelingerne i to VNTR-områder blandt europæere.

## Retsgenetiske undersøgelser i Danmark

I Danmark foretages alle retsgenetiske undersøgelser af Retsgenetisk afdeling på Retsmedicinsk Institut ved Københavns Universitet. Indtil 1990 anvendtes i retssager udelukkende såkaldt klassiske genetiske markørsystemer som blodtyper (ABO-, Rhesus- og MN-systemerne), vævstyper (HLA-systemerne) og forskellige enzym- og andre proteintyper i blodet.

I løbet af 1980'erne blev de RFLP-baserede DNA-profilanalyser udviklet, og i 1990 for første gang benyttet i retssager; til at begynde med som et supplement til de klassiske analyser. I dag (ultimo 1997) er de klassiske analyser stort set afskaffet i kriminalsagsarbejdet, og i faderskabs- og familiesammenføringsager har DNA-profilanalyserne afløst vævstypebestemmelserne i de sager hvor der anmodes om udvidet retsgenetisk undersøgelse.

De første PCR-baserede DNA-profilanalyser blev taget rutinemæssigt i anvendelse i faderskabs- og familiesammenføringsager i begyndelsen af 1995. Det drejer sig om analyser af et enkelt STR-område som afløser for de hidtil anvendte RFLP-baserede analyser af fem større VNTR-områder. Samme STR-analyse er fra midten af 1996 også blevet anvendt i kriminalsager som supplement til de RFLP-baserede analyser. Siden er der blevet udviklet en DNA-profilanalyse baseret på samtidig PCR-opformering og karakterisering af yderligere fire STR-områder. Denne 'analysepakke' er nu indført som rutine i både slægtskabsundersøgelser og kriminalsager.

Der er ingen tvivl om at de PCR-baserede DNA-profilanalyser snart vil have afløst de RFLP-baserede, i Europa som i USA; både af de praktiske grunde der er omtalt ovenfor i afsnittet 'Fordele og begrænsninger ved PCR', og fordi muligheden for at skelne to faktisk forskellige DNA-profiler fra hinanden, den såkaldte diskriminationsevne, er lige så stor eller større når man anvender PCR-baserede analyser.



# DNA-profilanalyse i praksis - Hvor sikker er konklusionen?



## Kriminalsager

I kriminalsager (mord, voldtægt) drejer det sig om at finde ud af, hvem der er ophavsmand m/k til et givet spor (blod- og/eller sædplet, evt. hår) fundet på offeret eller gerningsstedet. Såfremt sporets DNA-profil er forskellig fra en given mistænkt persons profil, kan den pågældende normalt udelukkes som ophavsmand. Derimod kan man ikke umiddelbart omvendt slutte, at hvis de to DNA-profiler er ovenstemmende, så må den mistænkte være ophavsmanden. Det kan nemlig ikke udelukkes med 100 % sikkerhed, at der findes flere personer med samme DNA-profil. Helt banalt vil, som tidligere nævnt, énæggede tvillinger mv. have identiske DNA-profiler. Også almindelige helsøskende vil kunne have samme DNA-profiler. Nærmere bestemt er der for hvert VNTR-locus en sandsynlighed på mindst 25 % for at to søskende findes at have de samme alleller. Hvis der analyseres i fire systemer er sandsynligheden for identitet mellem to søskendes DNA-profiler mindst 0,4 % (minimumsværdierne gælder i de situationer, som er de hyppigste, hvor begge forældre er heterozygot på de enkelte loci og ikke har nogen alleller fælles). Værdien af en DNA-profilanalyse kan derfor være begrænset, hvis to nært beslægtede personer, f.eks. to brødre, begge er mistænkte i en drabs- eller voldtægtssag - eller er udlagt som fædre til det samme barn. Imidlertid vil inddragelse af flere loci i analysen mindske sandsynligheden for at deres DNA-profiler forbliver identiske.

## Opgave 5

1. Forklar hvorfor der for et givet VNTR-locus er mindst 25 % sandsynlighed for at to søskende har arvet de samme alleller fra deres forældre.
2. Forklar hvorfor sandsynligheden for identitet mellem to helsøskendes DNA-profiler er mindst 0,4 %, hvis der analyseres i fire VNTR-systemer.

Det der er det kritiske spørgsmål i en typisk kriminalsag er følgende: *Hvis sporets og den mistænkte DNA-profiler er identiske, hvor stor er så sandsynligheden for at sporet stammer fra den mistænkte og ikke fra en anden ubeslægtet person?*

Den vægt man kan tillægge en overensstemmelse mellem DNA-profilerne, vil bl.a. afhænge af hvor stor sandsynligheden er for at en anden, tilfældigt udvalgt person har samme DNA-profil. For at kunne vurdere dette må man kende hyppighederne af de forskellige alleller i befolkningen, således at man kan beregne den forventede hyppighed af den pågældende DNA-profil. Man har derfor i de forskellige lande analyseret et stort antal personer for at få kendskab til de forskellige allellers hyppighed, og beregningerne viser at hvis DNA-profilen er bestemt ved analyse af de fire hyppigst anvendte RFLP-baserede VNTR-områder, vil sandsynligheden for, at en tilfældig anden person i befolkningen har samme profil, ligge mellem 1:100.000 og 1:100.000.000 (10).

I konklusionen af en retsgenetisk kriminalsagsundersøgelse hvor DNA-profilerne af et spor og en i sagen mistænkt person er identiske, vil standardudsagnet være at sandsynligheden for at en tilfældig, sagen uvedkommende person har samme DNA-profil er mindre end 1:100.000, dog med de nævnte forbehold vedrørende nære slægtninge (10).

Da STR-loci har færre alleller end de klassiske VNTR-loci, må der analyseres flere STR-områder for at opnå samme lille sandsynlighed, som anført ovenfor, for at en tilfældig anden person har samme DNA-profil. I den nu rutinemæssigt anvendte PCR-baserede DNA-profilanalyse undersøger man da også fem STR-områder, heraf fire i én og samme PCR-opformering. En metode baseret på samtidig analyse af seks systemer er under udvikling.



## Slægtskabsundersøgelser

Som tidligere nævnt drejer det sig i en faderskabssag om at finde den mand der har givet barnet de alleler i de analyserede VNTR-områder som det ikke har fået fra sin mor. Det er indlysende at da der er to alleler for hvert autosomt locus, vil der være mange forskellige DNA-profiler der har en allelkombination som den barnet har fået fra sin far.

Kort fortalt viser beregningerne for de RFLP-baserede DNA-profiler at sandsynligheden for at en tilfældigt udvalgt mand fra befolkningen har en DNA-profil der indeholder den kombination af alleler som barnefaderen skal have, vil være langt mindre end 1:10.000 i de allerfleste faderskabssager. Det vil altså sige, at risikoen for at man ved et rent tilfælde får involveret en uskyldig mand hvis profil passer i sagen, er mindre end 1:10.000, - igen med de sædvanlige forbehold for nært beslægtede faderemner (10).

I tilfælde af at den undersøgte mands DNA-profil ikke udelukker ham som barnefader, bliver konklusionen derfor at analyseresultatet taler for faderskabet med en vægt der overstiger forholdet 10.000:1, eller - udtrykt i procent - at baseret på DNA-profil-analysen er sandsynligheden, for at han faktisk er barnefaderen, over 99,99 % (10).

Familiesammenføringsager kan være en del mere komplicerede at have med at gøre, afhængigt af hvad det er for en problemstilling der skal løses, og om der er adgang til blodprøver fra de nøglepersoner der kan bidrage til løsningen.

## Mutationer som fejlkilde

Ligesom alt andet DNA kan også VNTR-alleler undergå mutationer fra den ene generation til den anden. Dette må tages i betragtning ved vurderingen af resultaterne i slægtskabsanalyser såsom faderskabs- og familiesammenføringsager. (Somatiske mutationer, dvs. mutationer i de almindelige kropsceller, vil ikke influere på resultatet af en DNA-profilanalyse, da de i givet fald kun vil ramme en meget lille brøkdel af det analyserede DNA og derfor ikke blive registreret. Mitokondrie-DNA udgør dog også her en undtagelse, se senere.)

Det der ikke så sjældent sker i VNTR-områder,

er at antallet af gentagelser af områdets karakteristiske sekvens ændres. Dette kan ske under DNA-replikation i kønscellernes forstadier og ved skæv overkrydsning i meiosen. Resultatet kan blive at et barn arver en allel som ingen af forældrene har i deres DNA-profil (se Figur 11).

Selvom de VNTR-områder der bruges ved DNA-profilanalyse i faderskabs- og familiesammenføringsager, er valgt blandt de mere stabile, er der alligevel tale om mutationsrater på 0,1-0,5 %, dvs. at 1 ud af hver 1000-200 kønsceller har en mutation i det pågældende VNTR-område. Som følge heraf vil man ikke med 100 % sikkerhed kunne udelukke en mand fra at være far til et givet barn, selvom der i et af områderne er uoverensstemmelse mellem hans og barnets DNA-profiler.

I sådanne tilfælde vil man ved at supplere med analyse af yderligere tre VNTR-områder kunne afklare situationen i næsten alle tilfælde. Det kan således beregnes at der er en meget stor sandsynlighed (99,9 %) for at en uskyldig mands DNA-profil også vil vise uoverensstemmelse med barnets i mindst ét af de tre ekstra loci. Sandsynligheden for samtidig mutation i to ud af otte loci vil være mindre end 1:100.000 (10).

## STR-systemerne i forskellige befolkningsgrupper

Et af de anvendte STR-loci har betegnelsen HUMTH01 (*human tyrosine hydrogenase*). Dette locus er beliggende på den korte arm af kromosom 11 i den første intron i genet for enzymet tyrosinhydrogenase; deraf locusbetegnelsen. Den gentagne sekvens er på fire basepar, og der er indtil videre fundet 6 alleler hos undersøgte ubeslægtede danskere og 5 hos en gruppe ubeslægtede grønlandske eskimoer. Allelfrekvenserne er imidlertid meget forskellige hos de to befolkningsgrupper, jf. tabel 1 hvor også resultaterne af tilsvarende undersøgelser af andre befolkningsgrupper er anført.

Det ses af tabellen at de forskellige alleler forekommer med meget forskellig hyppighed i de pågældende befolkningsgrupper. Disse hyppigheder er vigtige at kende da de danner grundlaget for de beregninger der, i en given kriminalsag eller slægtskabsundersøgelse, skal

**Tabel 1. Fordelingen af alleler i STR-området HUMTH01 i forskellige befolkningsgrupper**

	antal undersøgte personer	antallet af gentagelser i %						
		5	6	7	8	9	10	11
Danskere	189		24.6	20.1	12.4	9.5	0.3	
Eskimoer	147		10.9	68.7	5.1	3.7		
Hvide USA	372	0.5	22.6	15.9	11.0	14.3	0.5	
Sorte USA	370		13.5	37.0	21.1	14.6		
Mexikanere USA	384		20.8	33.3	6.8	14.3		
Asiater	154		10.4	26.0	5.2	44.2	4.6	0.7

give svar på spørgsmålet: Hvor stor er sandsynligheden for at en person hvis DNA-profil stemmer overens med den eftersøgte, kan være en uskyldig.

### Opgave 6

1. Indfør resultaterne fra de forskellige grupper i et koordinatsystem som blokdiagrammer, ligesom i Figureerne 8 og 9. Indtegn evt. hver befolkning i hvert sit koordinatsystem med samme koordinater.
2. Beskriv ligheder og forskelle mellem de forskellige befolkninger.
3. Overvej med hvilken sikkerhed man kan konkludere, at en given person er gerningsmand hvis hans DNA-profil i HUMTH01-systemet passer i henholdsvis en mordsag og en faderskabssag. (Det forudsættes, at der ikke er foretaget analyse i andre systemer.)
4. Overvej betydningen af forskellene mellem befolkningsgrupperne i relation til retssikkerheden.

### Analyse af mitokondrie-DNA

Som tidligere nævnt har analyse af mitokondrie-DNA (mtDNA) vundet indpas både ved personidentifikation og i antropologiske og arkæologiske undersøgelser. Baggrunden er den meget store sekvensvariation i mtDNA. Den skyldes lejlighedsvis mutationer gennem årtusinderne og gør at to personer der ikke er beslægtet gennem en ubrudt kvindelinie inden for de sidste mange hundrede år, med stor

sandsynlighed vil udvise en eller flere forskelle i deres mtDNA-sekvens. Ca. 50 % af sekvensvariationen er lokaliseret i to ikke-kodende områder i mtDNA på tilsammen kun ca. 750 basepar. Disse områder er højvariable. Det er derfor dem analyserne drejer sig om.

Mutationsraten er større i mtDNA end i kerne-DNA fordi der mangler DNA reparationsmekanismer, som de findes i kernen. Alligevel er det sjældent at man hos en person finder mere end én mtDNA-sekvens. Dog har man nu erfaring for at visse basepar i mtDNA-molekylet muterer så hyppigt at det ikke er helt sjældent at finde mtDNA hos en og samme person, hvor noget har den 'gamle' sekvens og noget skiller sig ud ved at have en ændring i en af de positioner der muterer hyppigt. For at dette overhovedet kan påvises ved en rutineanalyse, kræver det at det muterede mtDNA udgør 5 % eller derover af det samlede mtDNA i de pågældende celler. Man kan f.eks. komme ud for at mtDNA-sekvensen i hår fra en person er forskellig fra den man finder i vedkommendes blod, for et enkelt basepars vedkommende.

Lad os tænke os at man har analyseret mtDNA fra nogle hår fundet på et gerningssted. Ved sammenligning med en blodprøve fra en mistænkt finder man at der er uoverensstemmelse mellem de to mtDNA-sekvenser for et af de forholdsvis hyppigt muterende basepars vedkommende. Dette vil nu ikke længere være tilstrækkelig grund til at udelukke den mistænkte som ophavsmand til de pågældende hår.

## Zar Nikolai II og hans familie - et mysterium opklares

Det mest berømte eksempel på forekomst af to mtDNA-sekvenser hos samme person stammer fra identifikationen af skeletresterne af den sidste russiske zar og hans familie, i sig selv en dramatisk historie.

Zar Nikolai II blev sammen med sin kone og deres fem børn henrettet af bolsjevikkerne i 1918. Deres død og begravelse var i mange år omgivet af stor hemmelighedsfuldhed.

Men i 1979 fandt nogle privatpersoner det sted hvor de formentlig var blevet begravet sammen med nogle medlemmer af deres stab. Først efter Sovjetunionens opløsning blev der adgang til at foretage de retsmedicinske og antropologiske undersøgelser som skulle gøre det muligt at fastslå at fem af de fundne skeletter stammede fra zaren, hans kone og tre af deres døtre (2,3). To kunne bedømmes til at stamme fra et midaldrende par og de tre fra unge, voksne kvinder.

Først lykkedes det, ved kønsbestemmelse og STR-analyser af DNA ekstraheret fra knoglerne at fastslå at fem af de ni skeletter i massegraven, med stor sandsynlighed repræsenterede en kernefamilie bestående af forældre og tre voksne døtre. Analyse af mtDNA viste at de fire kvinder havde identiske sekvenser hvilket yderligere sandsynliggjorde at den ældre kvinde var mor til de tre yngre. Den kendsgerning at den ældre kvindes tandsæt bl.a. var behandlet med fyldninger af platin, talte for at der meget vel kunne være tale om zarinaen.

Identifikationen af kvinden som zarinaen og manden som zaren skete efterfølgende ved sammenlignende undersøgelser af mtDNA-sekvenserne fra dem og nulevende personer som ifølge de detaljerede slægtsoplysninger var beslægtede med zarinaen henholdsvis zaren gennem ubrudte kvindeliner. I opklaringen af

zarinaens identitet blev den britiske Prins Philip, hertugen af Edinburgh, nøglepersonen. Prins Philip er datterdattersøn af zarinaens mor, og hans mtDNA-sekvens skulle derfor være identisk med den man havde fundet i gravens fire kvindeskeletter. Det var den.



For zarens vedkommende fandt man frem til to nulevende adelige personer der begge var efterkommere, i direkte kvindelinie, af zarens mor. De to havde som forventet

identiske mtDNA-sekvenser, en sekvens som også fandtes i ekstraktet fra det skelet der antoges at være zarens. Der var imidlertid det usædvanlige at man i det formodede zarskelet også kunne påvise mtDNA som i et enkelt basepar adskilte sig fra den anden sekvens. For at gøre en lang historie kort: Man fik på baggrund heraf tilladelse til også at undersøge skelettet af zar Nikolais ældre broder der var død og begravet på normal vis. Da hans mtDNA viste de samme to sekvenser som man havde fundet i det formodede zarskelet, kunne man afslutte sagen som opklaret idet man kunne konstatere at zar Nikolai og hans bror repræsenterer nogle af de forholdsvis sjældne tilfælde hvor man finder to forskellige mtDNA-sekvenser hos samme person (3).

Endelig kan det nævnes at man i kølvandet på opklaringen af 'zar-mysteriet' fik mulighed for at afsløre at en nu afdød, amerikansk gift kvinde der i hele sin voksentilværelse havde hævdet at være zarparrets datter Anastasia, ikke kunne være barn af zarinaen eller på anden måde beslægtet med hende, eller zaren for den sags skyld, gennem en ubrudt kvindelinie (4). Man fik mulighed for at undersøge noget af en tyndtarmsprøve der var blevet taget, og gemt, i forbindelse med en hospitalsindlæggelse i 1979, og kvindens mtDNA-sekvens viste sig forskellig fra Prins Philips (og dermed fra zarinaens) i seks basepar. Til gengæld var den identisk med mtDNA-sekvensen hos en nulevende polsk mand som nogle mente var dattersøn af en søster til kvinden.

# Diskussion



Her følger en række forhold man bør være opmærksom på i forbindelse med den rutinemæssige anvendelse af DNA-profilanalyser:

## Prøvernes kvalitet

DNA fra f. eks. lig, blodpletter og andre spor kan være delvis nedbrudt og der er måske ikke ret meget af det. Hvilke problemer kan det give for analysen og fortolkningen af analyseresultaterne?

## Fejl og unøjagtigheder i prøvetagningen

Det er mennesker der udtager prøverne fra de implicerede personer, og hvor der er mennesker involveret er der også mulighed for at lave fejl dels ved udtagningen dels ved registreringen og opbevaringen af prøverne. Der er også eksempler på at prøver bevidst er blevet forbyttet. Hvordan kan man tage højde for den situation?

## DNA-analyse som eneste bevis

Hvordan ville I forholde jer til en sag, hvor resultatet af en DNA-profilanalyse er det eneste bevis?

## Privatlivets fred

En DNA-undersøgelse af familiemedlemmer kan af og til afsløre at de sociale forældre ikke altid også er de biologiske forældre. Det er anslået, at et par procent af alle børn ikke har den biologiske far de tror de har. Desuden har visse kulturer en bredere fortolkning af familiebegrebet. Hvordan sikrer man sig mod at sådanne følsomme data kommer i de forkerte hænder?

## Database over udførte DNA-profilanalyser

Bør det være lovligt for politiet at oprette en database med DNA-profiler fra alle, dømte såvel som frikendte, der er undersøgt i bestemte kriminalsager? Hvem må i givet

fald få og bruge oplysningerne?

## Analyselaboratoriernes uafhængighed

DNA-profilanalyser kan udføres med relativt simpelt udstyr og materialer. Bør der stilles specielle krav til laboratorier der vil udføre disse test, eller bør markedet være frit så anklager og forsvarer hver for sig kan hyre et laboratorium til at udføre analysen for deres klient?

## Etniske spørgsmål

De forskellige VNTR-systemers alleler er fordelt med forskellig frekvens blandt forskellige etniske grupper (ligesom det er tilfældet med alle andre genetiske markører). Hvordan skal man forholde sig til, at ordensmagten måske specielt foretager eftersøgning blandt en bestemt etnisk gruppe, fordi det genetiske spor fundet på offeret har en bestemt profil der er hyppigere forekommende i denne etniske gruppe end andre?

## Kontrol

Der har været tale om at anbringe den personlige DNA-profil på folks identitetskort eller pas. Diskutér både negative og positive afspekter af dette. Det kunne f. eks. sammenlignes med hvad man tidligere har gjort for at kontrollere den enkeltes bevægelsesfrihed, jvf. plakater man hængte op med billede af eftersøgte personer.

## Videnskabelige beviser

Undersøgelsesresultater såsom DNA-profilanalyserne fremlægges ofte i retten som videnskabelige beviser. Hvordan sikres det at den usikkerhed som altid er til stede, også kommer frem i retten?

## Litteraturliste

1. Olaisen B., Stenersen M. og Mevåg B. 1997. *Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster*. Nature Genetics **15**: 402-405.
2. Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C. et al. 1994. *Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*. Nature Genetics **6**: 130-135.
3. Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K. et al. 1996. *Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II*. Nature Genetics **12**: 417-420.
4. Stoneking M., Melton T., Nott J. et al. 1995. *Establishing the identity of Anna Anderson Manahan*. Nature Genetics **9**: 9-10.
5. Krings M., Stone A., Schmitz R.W. et al. 1997. *Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans*. Cell **90**: 19-30.
6. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. 1985. *Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science **230**: 1350-1354.
7. Saiki R.K., Gelfand D., Stoffel S. et al. 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science **239**: 487-491.
8. Mullis K. 1990. *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. Scientific American **262** (April): 56-61.
9. Findlay I., Taylor A., Quircke P., Frazier R. og Urquhart A. 1997. *DNA fingerprinting from single cells*. Nature **389**: 555-556.
10. Eriksen B. og Hansen H.E. 1996. Genetikken i retssalene. Dansk Kemi **5**: 8-11.
11. Eksperimentel Genteknologi, Nucleus 1989.



# Modelforsøg

Hvis man ønsker billigt at illustrere hvordan restriktionszymer klipper i DNA kan man som modelforsøg klippe DNA fra bakteriofagen lambda med forskellige restriktionszymer. En udførlig beskrivelse findes i "Eksperimentel Genteknologi", Nucleus 1989. De nødvendige materialer kan fås ved henvendelse til forskellige kemikaliefirmaer. Bioteknologisk institut, Kogle Allé 2, 2970 Hørsholm kan levere lambda-DNA og restriktionszymer.

NCBE i England leverer et kit kaldet "The Lambda Protocol" der indeholder lambda-DNA og restriktionszymer i tørret form sammen med de nødvendige materialer samt fem billige elektroforesekar. Det fås ved henvendelse til: NCBE, University of Reading, Whiteknights, Reading, RG6 2AJ, UK. Telefon: 0044-118-987-3743. Fax: 0044-118-975-0140. E-mail: C.Shearer@reading.ac.uk.

## Hvem er skyldig?

Her følger opskriften på et modelforsøg som kan udføres i et skolelaboratorium forsynet med et agarosegel-elektroforeseapparat. Forsøget er en viderebearbejdning af Knud Johnsens "Find morderen". Den valgte historie er

### Pige Myrdet efter skolefest

Liget af en pige bliver fundet i et krat nær skolen. Hendes tidligere kæreste og hendes lærer var i går i langvarige forhør hos politiet.

Der er nu fastslået at pigen blev voldtaget før hun blev dræbt. Ved en undersøgelse af liget har man fundet spor af sæd i pigens vagina. Herfra er der allerede udtaget en prøve til brug for en DNA-profilanalyse. Den skal hjælpe politiet med at finde morderen.

opdigtet.

Når modelforsøget udføres, er det vigtigt at forklare eleverne at den anvendte metode afviger fra den professionelle. Når det alligevel kan anbefales at lave forsøget som beskrevet, skyldes det, at resultatet (DNA-mønstret i elektroforesegelen) ligner de professionelt udførte, klassiske DNA-analyser.

## Undersøgelse

Der er taget fire DNA-prøver:

- prøve 1 ? DNA fra sædprøven
- prøve 2 A DNA fra pigens lærer
- prøve 3 B DNA fra pigens tidligere kæreste
- prøve 4 C Pigens eget DNA

Til undersøgelsen anvendes to forskellige restriktionszymer (klippezymer). *HindIII* tørret i grønne minirør og *BamHI* tørret i blå minirør.

## Vejledning

I fordeler arbejdet mellem jer i klassen, således at der er et grønt hold og et blåt hold. Hvert hold får udleveret de fire ovennævnte DNA-prøver samt fire minirør med et af enzymerne.

1. Placér minirørene med enzymer i en holder.
2. Tilsæt 10 µL demineraliseret vand til hvert af de fire enzymrør og lad dem stå i 5 minutter.
3. Bland vand og enzymer, i hvert rør for sig, ved at suge op og ned mange gange med pipetten. Undgå at suge luft med op, så der dannes skum.
4. Placér de fire rør med DNA-prøver i en holder og tilsæt 10 µL af de opløste enzymer til hver af DNA-prøverne. Sørg for at enzymopløsningerne og DNA-prøverne blandes godt.
5. Placér de fire DNA/enzym-blandinger i et vandbad på 37° C i 30 minutter



- (brug en lille flamengoplade med huller i som holder).
6. Mens prøverne er i vandbadet, støbes to elektroforesegeler. Til 100 mL gel bruges 0,7 g agarose som smeltes i 90 mL demineraliseret vand. Efter afkøling til ca. 60°C tilsættes 10 mL gelbuffer (og 100 µL ethidiumbromidopløsning (stamopløsning 1 mg/mL))\* . Derefter støbes gelen i en gelform ved brug af en kam der danner 4 brønde; eller eventuelt 6, hvor de to yderste bruges til en størrelsesmarkør, f. eks. lambda-DNA behandlet med et eller flere restriktionsenzymmer.
  7. Når gelen er størknet anbringes den i elektroforesekarret der fyldes med elektroforesebuffer indtil gelen netop er dækket. Først nu tages kammen forsigtigt op så brøndene fyldes med buffer.
  8. Efter 30 min i vandbadet anbringes prøverne igen i en holder, og der tilsættes 5 µL markørfarve.
  9. Placér 20 µL af hver af de fire prøver i hver deres brønd efter en aftalt plan. (Tilsæt eventuelt en klippet lambda-prøve som markør, hvis der er ledige brønde i gelen).
  10. Slut strømmen og lad elektroforesen køre ca. 90 minutter, eller indtil markørfarven har nået den modsatte kant af elektroforesegelen.
  11. Efter endt elektroforese løftes gelen ud af elektroforesekarret, gennemlyses med UV-lys og fotograferes.

\* Hvis den farves med Azur A kan resultatet direkte ses, og den kan præsenteres for hele klassen hvis den anbringes på en overhead. Vedrørende farveproceduren med Azur A se "The Lambda Protocol" fra NCBE, Reading.

### Materialer

Indkøbte plasmider, eller andet DNA, der maksimalt klippes to gange med de anvendte enzymer.  
De fire foreslåede DNA-prøver består af:

- ? 2 µL pC508 (0,1 µg/µL)  
+ 23 µL demineraliseret vand
- A 2 µL pC508 (0,1 µg/µL)  
+ 23 µL demineraliseret vand
- B 2 µL pUC18 (0,1 µg/µL)  
+ 23 µL demineraliseret vand
- C 3 µL pUC18 + 2 µL pBR 322 (0,1 µg/µL)  
+ 20 µL demineraliseret vand
- Prøverne fordeles i 4 blå og 4 grønne Eppendorfrør med 10 µL i hver. (Prøverne kan forberedes nogle dage i forvejen og anbringes i køleskabet).
- Restriktionsenzymmer: *Hind*III og *Bam*HI.
- Gelbuffer: Til 100 mL bruges 10,90 g TRIS, 5,57 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> og 0,94 g EDTA. Det er ikke nødvendigt at justere pH som vil blive 8,3-8,4. De afvejede kemikalier opløses i 80 mL demineraliseret vand og fyldes op til 100 mL med demineraliseret vand. Bufferen kan også købes færdiglavet. Den kan holde sig i køleskab i måneder og kan genbruges nogle gange.
- Elektroforesebuffer: Fremstilles ved 10 x fortynding af gelbuffer.
- Agarose
- Ethidiumbromid (stamopløsning), eller en anden DNA farve f. eks. Azur A.\*\*
- Markørfarve, bromphenolblåt (kan købes færdig)
- Mikropipetter eller automatpipetter
- Pipettespidser, engangs
- Eppendorfrør
- Vandbad 37 °C

\*\* Bemærk at alle farver og andre stoffer der binder sig til DNA, er i princippet mutagene og skal derfor håndteres forsigtigt.

Materialerne kan købes hos forskellige kemikaliefirmaer.  
Plasmiderne kan købes hos Bioteknologisk Institut, DTU.  
NCBE leverer DNA, restriktionsenzymmer og andre nødvendige kemikalier.