

Hur går en DNA-analys till?

DNA utmålas ofta som det senaste undermedlet när det gäller att sätta fast brottslingar. Men vad är det som analyseras och hur går en kriminalteknisk DNA-analys till?

Här får vi följa spårets väg från ett "vanligt" villainbrott, genom handläggningar och analyser hos polis och SKL fram till att en gärningsman har hittats.

Vid villainbrottet var det mycket som var omkringstokat. Kriminalteknikern från polisens tekniska rotel får en hel del att arbeta med. En sak fångar särskilt hans uppmärksamhet: En halvdrucken läskedrycksflaska bredvid kylskåpet. En koll med villaägaren bekräftar att den flaskan inte stod där när han lämnade villan på morgonen. Alltså är det troligt att inbrottstjuven har druckit ur den.

Kriminalteknikern tar fram en BioPack, som är påse och tops specialkonstruerade för att säkra biologiska spår. Han topsar av flasköppningen, i hopp om att säkra lite saliv/sekret och lägger tillbaka topsen i påsen samt fyller i etiketten på framsidan.

Tillbaka på roteln skickar han via IntraPolis, som är polisens intranät, en digital begäran om DNA-undersökning till SKL. Han begär undersökning K12 som är sekret. När han trycker på knappen "Skicka" sänds nu denna begäran från kriminalteknikerns dator rakt in i ärendehanteringssystemet Forum på SKL.

Samtidigt skrivs denna begäran om undersökning ut på en vanlig skrivare på den tekniska roteln. Som följesedel bifogar han denna utskrift till SKL genom att lägga den i packsedelsfickan på utsidan av försändelsen.

Materialet kommer till SKL

På SKL ser man i Forum att ärendet är på väg och märker upp en brun mapp med ärendets nummer. Den här mappen kommer sedan att följa materialet på dess väg genom SKL, inklusive alla skrivelser och andra handlingar som kan

På brottsplatsen topsas läskedrycksflaskan av.



tillkomma. En bekräftelse på att ärendet nu är registrerat hos SKL mailas tillbaka till polisen.

När försändelsen med topsen i BioPacken någon dag senare kommer till SKL ligger alltså en mapp redan färdig och väntar. Eftersom utskriften av den digitala begäran finns med i packsedelsfickan kan den personal som går igenom dagens material redan på utsidan av försändelsen se vad den innehåller. Innan materialet läggs in i mappen kontrolleras att alla uppgifter stämmer. Därefter placeras mapp med material i ett särskilt materialrum.

I fortsättningen kommer materialet att handhas av flera olika personer och grupper, var och en med sin speciella uppgift i kedjan. Vid varje nytt moment sker därför noggranna kontroller av att nummer och material stämmer ihop. Ofta är man för säkerhets skull två personer, som båda kontrollerar och signerar att allt är rätt utfört.

Uppackning och spårsäkring

Personal från Biologienheten hämtar dagligen material från materialrummet. Man kontrollerar att både mappen med handlingar och själva materialet är med samt skiljer på olika typer av ärenden och lägger dessa i olika högar. Topsen från inbrottet är ett registerärende och får nu både materialnummer och löpnummer i Forum.

Man bedömer också vilken extraktionsmetod för utvinning av DNA:t som passar bäst och beställer den. Det finns flera olika metoder att tillgå beroende på hur smutsigt materialet är. För just den här topsen beställer man "Chelex".

Topsen läggs i en BioPack-påse.



Vad är DNA?

DNA (Deoxyribo Nucleic Acid) är den kemiska benämningen på vår arvs massa. DNA finns i alla cellkärnor. Vi ärver hälften av det kärnbärande DNA:t från modern och hälften från fadern.

DNA-molekylen består av två sammanbundna strängar med fyra olika kvävebaser, (nukleotider); adenin (A), tymin (T), cytosin (C) och guanin (G). Ett A i den ena strängen motsvaras alltid av ett T i den andra och ett C motsvaras alltid av ett G. Det två strängarna vrider sig runt varandra, därför talar man om DNA-spiral. En DNA-molekyl består av cirka tre miljarder sådana baspar.

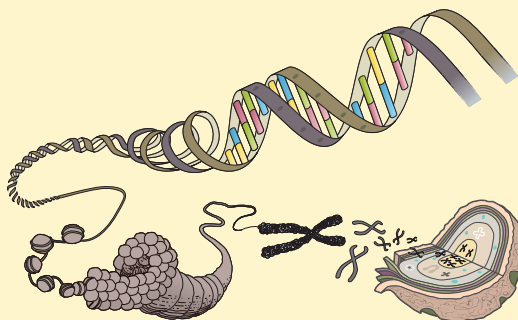


Illustration: Martin Ek

Varje ärende packas upp separat för att undvika risken för kontamination (överföring av DNA) mellan proverna. All bomull från topsen klipps därefter ner i ett mikrofugrör (ett litet provrör med lock) som märks med löpnummer och tvådimensionella "streckkoder" för att utesluta risken för sammansmältning med andra prover. Därefter ställs det i en frys i väntan på extraktion och analys.

Extraktion - utvinning av DNA

I det lilla mikrofugröret har man nu förhoppningsvis sekret, det vill säga epitelceller som fastnat på bitarna av topsen. Först tillsätter man en milliliter vatten (det är en stor mängd i de här sammanhangen) för att få cellerna att släppa från topsens bomullsyta och skakar om alltihop noga med hjälp av en Vortex, en skakmaskin, flera gånger.

Därefter centrifugeras proverna i tiotusen varv per minut i tre minuter. Resultatet blir att cellerna samlas till en liten klump, en pellet som är så liten att den nästan inte syns, i botten av mikrofugröret. Det mesta av vattnet ovanför sugts bort med en vanlig handpipett.

För att rena provet tillsätter man nu Chelex-kulor. Det är små kulor av ett material som binder till sig tvåvärdade joner som annars kan störa den kommande PCR-kopieringen.

Provet celler är dock fortfarande hela och DNA:t finns kvar inuti cellerna. För att få loss DNA:t ställer man in provet i ett värmeskåp i först 56 grader och sedan 100 grader. Då förstörs nämligen cellernas och cellkärnornas väggar och själva DNA:t, som tål högre temperaturer, blir fritt.

Koncentrationsberäkning

Provet är nu löst i 200 mikroliter vatten varefter man utför en koncentrationsberäkning. Det innebär att man med hjälp av en metod som kallas realtids-PCR tar reda på hur mycket DNA som finns i provet. Det är en förstörande analys där man tar ut en mycket liten del av provet och kopierar upp det. Resultatet jämförs med en standardkurva med kända DNA-mängder.

Det gäller nämligen att för den slutliga analysen använda en lagom mängd DNA. För lite DNA ger dåliga och svårästa resultat och för mycket gör att analysen blir otillförlitlig eftersom den "slår i taket".

För själva analysen vill man ha motsvarande 80-100 cellers DNA och koncentrationsberäkningen ger svaret på hur mycket man ska ta av provet för att hamna i det området. Om provet skulle innehålla inget eller för lite DNA analyseras det inte vidare.



Nedklippning i ett mikrofugrör.



Vatten tillsätts.



Allt skakas noga om flera gånger.

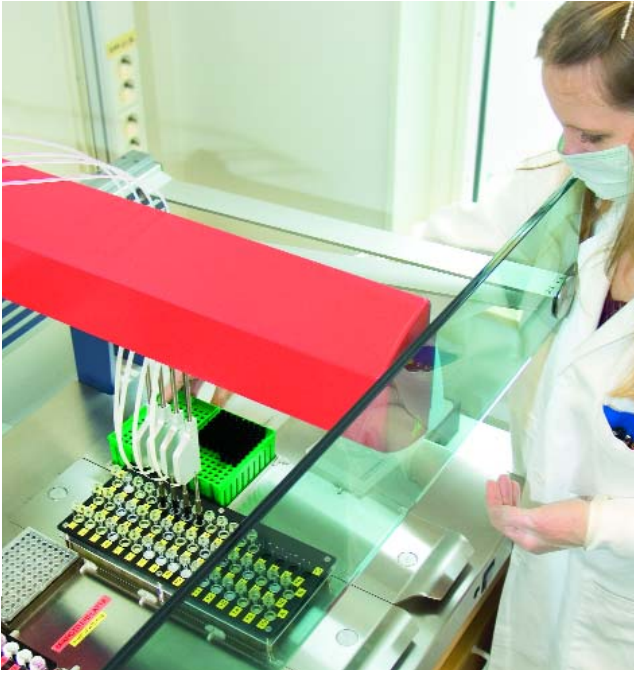
Registerärenden är spår och material från i huvudsak mängdbrott utan misstänkta.

Jämförelsematerial är blodprov eller salivprov från personer.

Mikroliter = μl = miljondels liter

Milliliter = ml = tusendels liter

Pipetteringsroboten flyttar provet från mikrofugrören till plattan.



Plattan sätts in i PCR-maskinen.



Vad analyseras?

Vid en rutinmässig kriminalteknisk DNA-analys undersöks cirka en miljondel av DNA-molekylens baspar, det innebär tio olika STR-områden samt området för könsbestämning. Ett STR-område består av sekvenser om 2-5 baser som upprepas ett flertal gånger. Det som mäts vid analysen är hur många gånger upprepningarna sker, eftersom detta varierar mycket mellan olika individer. Alla har DNA från både moder och fader, alltså har man dubbel uppsättning av vart och ett av dessa områden. Det innebär att man har antingen två lika eller två olika varianter i varje STR-område.

Vid fall där nära släktingar visar sig ha mycket snarlika DNA-profiler, eller vid identifieringsärenden då släktskapsberäkningar genomförs, kan ytterligare fem STR-områden analyseras.

Kopiering

Nu ska själva kopieringen göras. Det gäller att hitta tio i förväg utvalda STR-områden på DNA:t samt området för könsbestämning. Dessa bitar ska kopieras upp i ett stort antal för sedan sker själva DNA-analysen genom att man tar reda på hur långa STR-bitarna inom de olika områdena är.

Till detta tar man ut den mängd av provet som koncentrationsberäkningen visade på, för "vår" tops handlade det om 10 mikroliter, och blandar detta med en PCR-mix. Ursprungsprovet fryses ner och sparas i två år.

PCR-mixen är en blandning av många olika ämnen som hjälper till och används vid uppkopieringen av DNA. Först och främst innehåller den byggmaterial till DNA, det vill säga de olika baser, nukleotider, som DNA består av. Dessutom ingår primrar som har till uppgift att hitta STR-bitarna och visa var på DNA:t kopieringen ska börja. Till primrarna är även fluoroforer (som är inmärkt i tre olika färger) bundna. Det är fluorescensen hos dessa som i slutet av analysen visar vad som ska detekteras. Taq-polymeras är ett enzym som tål hög värme och som styr själva byggandet av kopiorna.

Blandningen av prov och PCR-mix placeras i en brunn i en platta som totalt innehåller 96 brunnar. Man använder inte alla brunnar så på varje platta får man plats med 44 prover samt kontroller. Negativ-kontrollen innehåller bara vatten och ska alltså inte ge något DNA-resultat alls. Positiv-kontrollen innehåller ett DNA-prov där mängden och resultatet är känt.

Plattan placeras i en PCR-maskin som egentligen är ett programmerbart värmeblock som ändrar temperatur efter ett visst schema.

Först upphetar man till 94 grader. Då sårar den dubbelsträngade DNA-molekylen på sig till två enkelsträngar och alla enzymreaktioner upphör. Därefter kyls man till 59 grader, varpå primrarna fäster på sina specifika ställen på strängarna.

När temperaturen sedan höjs till 72 grader använder Taq-polymeraset PCR-mixens nukleotider för att bygga upp dubbelsträngade kopior av STR-bitarna. Det hela bygger på att A och T bara kan kopplas med varandra liksom C och G på samma sätt bara kan kopplas ihop med varandra. Har enkelsträngen sekvensen A-T-T-C-A-T-T-C kan inte polymeraset bygga på med något annat än T-A-A-G-T-A-A-G.

För varje cykel, det vill säga omgång om dessa tre olika temperatursteg om vardera en minut, har antalet kopior av STR-bitarna fördubblats. Efter första cykeln har man dubbelt så många kopior som från början, efter andra fyra gånger så många, efter tredje sexton gånger och så vidare. Vid en vanlig DNA-analys kör man 28 cykler. På cirka tre timmar får man omkring 100 miljoner kopior.

PCR-metoden är mycket lik kroppens egen DNA-process vid celledelning. När en cell delas och blir två celler fördubblas även DNA:t - och denna kopiering sker exakt, något som är en stor fördel vid en kriminalteknisk analys där exakthet och reproducerbarhet är ett måste.

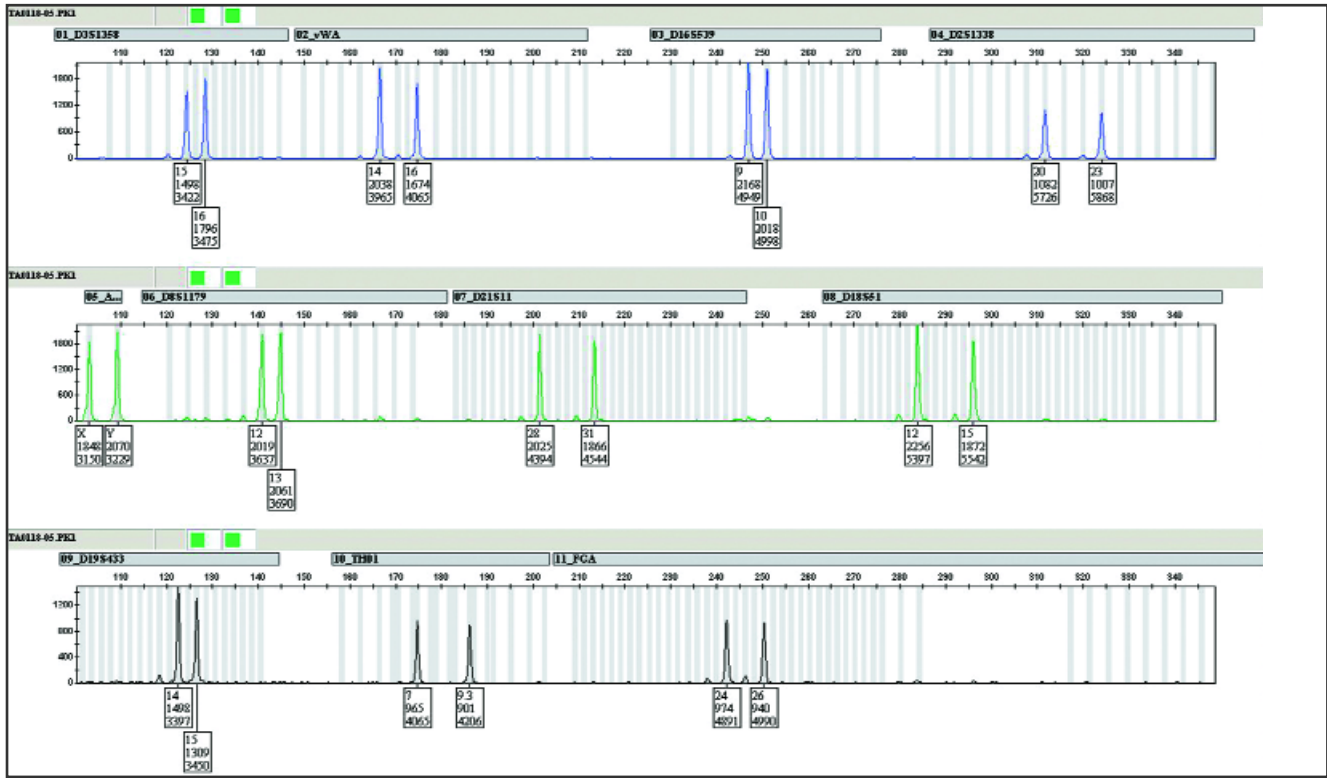
Förkortningar

CODIS Combined DNA Index System

DNA Deoxyribo Nucleic Acid

PCR Polymerase Chain Reaction

STR Short Tandem Repeats



Exempel på elektroferogram.

Separering och utläsning

Slutresultatet av PCR-kopieringen av spåret på vår tops är nu ett prov som innehåller stora mängder av olika STR-bitar som är märkta med molekyler som kommer att fluorescera vid den slutliga utläsningen. Dessa ska nu sorteras och separeras från varandra. Det gör man med hjälp av kapillär-elektrofores som utnyttjar det faktum att STR-bitarna är negativt laddade.

Plattan lyfts ur PCR-maskinen och placeras i DNA-typbestämningsmaskinen. Denna suger upp provet i små kapillärer och kopplar på en stark elektrisk spänning. De olika STR-bitarna börjar vandra genom kapillären. De kortaste fragmenten rör sig snabbast igenom och de längre tar lite mer tid på sig.

Nu kan man med hjälp av avancerade datorer skilja mellan STR-bitar som har olika längd och olika färg. I slutet av kapillären finns en detektor som mäter fluorescensen och visar det hela som toppar i ett elektroferogram. Här finns tre olika kanaler vilka är samma som de tre färgerna. Det är topparnas placering som är intressant, topparnas höjd anger kvaliteten. Det var ju för att få lagom höga toppar som man inledde med att göra en koncentrationsberäkning.

Samtidigt körs en standard som innehåller DNA-bitar med kända längder. Kalibrering sker alltså vid varje analys.



Plattan sätts in i DNA-typbestämningsmaskinen.

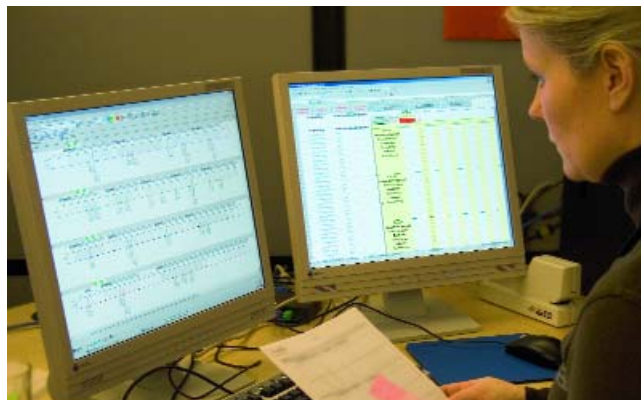


Kapillärerna - mycket smala rör - syns i högra delen av bilden.

GeneMapper

GeneMapper är det dataprogram som omvandlar topparna i elektroferogrammet till en sifferkombination, själva DNA-profilen. Här görs också en kontroll där GeneMapper visar på prover där det finns frågetecken eller differenser enligt SKL:s kvalitetskriterier. Systemet är till exempel inställt för att varna vid ofullständiga DNA-profiler och vid blandbilder, det vill säga då man kan misstänka att det i provet finns DNA från två eller flera personer.

Spåret från vår tops ger en fullständig DNA-profil i GeneMapper och den sifferkombination som blir resultatet skickas till Forum, som kopplar ihop det hela med rätt ärende.



Utvärdering med hjälp av GeneMapper.

