

# FORENSISCH DNA-ONDERZOEK

## HANDLEIDING VOOR DOCENTEN

Voor u ligt de docentenhandleiding bij het practicum forensisch DNA-onderzoek, onderdeel van de leskist DNA. De leskist DNA bestaat uit vier afzonderlijke practicumsets, verdeeld over negen kisten.

De kisten bevatten allerlei instrumenten waarmee leerlingen relatief zelfstandig onderzoek aan DNA en eiwitten kunnen doen. Onderdeel van de leskist zijn bijvoorbeeld een PCR-apparaat, apparatuur voor gelelektroforese, maar ook micropipetten en koelers en epjes. De practicumsets DNA (vijf kisten) en eiwit (vier kisten) worden in principe afzonderlijk aan scholen uitgeleend. De andere twee practicumsets (een stempelpracticum en een bioinformaticapracticum) kunnen zowel afzonderlijk geleend en gebruikt worden, als in combinatie met een andere set.

De practicumsets kunnen op verschillende manieren gebruikt worden. Per set is een practicum volledig uitgewerkt. Op deze manier kunt u met een hele klas één of meerdere lessen aan de slag. U kunt de apparatuur natuurlijk ook prima gebruiken voor andere activiteiten, bijvoorbeeld door leerlingen de gelegenheid te bieden om voor hun profielwerkstuk enkele weken gebruik te maken van de apparatuur.

De practica die speciaal voor deze leskist ontwikkeld zijn sluiten aan bij actueel onderzoek van wetenschappers van de UvA. We willen de betrokken wetenschappers, Pernette Verschure, Melanie Rosenhart en Martijs Jonker bijzonder hartelijk danken voor hun enthousiaste medewerking.

Wij wensen u en uw leerlingen leuke en leerzame lessen toe.

Namens De Praktijk,

Caspar Geraedts, Robin Kleian, Susanne Jansen en Alex Verkade



UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

De **P**raktijk

*natuurwetenschappelijk onderwijs*

## PRAKTISCHE INFORMATIE

### *het practicum in het kort*

Dit practicum staat in het teken van forensisch DNA-onderzoek. Leerlingen krijgen de beschikking over het sporenmateriaal van een (gefingeerde) moordzaak. De DNA-profielen van het slachtoffer (SL) en drie verdachten (V1 t/m V3) moet worden vergeleken met dat van een bloedspoor dat is gevonden op de plaats delict (PD). Het maken van de DNA-profielen gaat grofweg in de volgende stappen:

- target DNA kopiëren met PCR (Polymerase Chain Reaction)
- DNA scheiden met gelelektroforese
- DNA op gel zichtbaar maken

Daarna bepalen de leerlingen of er een match (exacte overeenkomst) is tussen gevonden DNA-profielen, en schrijven zij een rapport aan de officier van justitie. Voorafgaand aan het practicum voeren de leerlingen een voorbereidende les uit, waarin de belangrijkste technieken van het practicum aan bod komen.

### *doelgroep*

De practica bij de leskist DNA zijn ontwikkeld voor leerlingen in de bovenbouw havo en vwo. De bedoeling is dat de leerlingen grotendeels zelfstandig aan de practica werken. Met enige aanpassingen en de nodige sturing van de docent zijn de practica en de instrumenten eventueel ook in onderbouwklassen en op het vmbo te gebruiken.

### *plaats in curriculum en voorkennis*

Het ligt voor de hand om het practicum forensisch DNA-onderzoek in te zetten bij het vak biologie, bijvoorbeeld in aansluiting op de onderwerpen DNA en moleculaire genetica. Daarnaast is het natuurlijk ook mogelijk om het practicum te gebruiken bij het vak NLT of ANW. Het is belangrijk dat de leerlingen – voordat zij met het practicum aan de slag gaan – in grote lijnen bekend zijn met de bouw van DNA en de functie van DNA als drager van erfelijke eigenschappen.

### *planning practicum*

Het practicum forensisch DNA-onderzoek bestaat uit een voorbereidende les en het practicum zelf. Tabel 1 geeft de geschatte tijdsduur van elk onderdeel van het practicum.

Tabel 1. Geschatte tijdsduur van de onderdelen van het practicum.

PCR	75 min. (waaronder 15 min. pipetteren en 60 min. voor de PCR)
gelelektroforese	75 min. (ong. 15 voor het laden, en 60 min. voor de elektroforese)
kleuren	minimaal 1 uur (ong. 5 min. kleuren en minimaal 1 uur ontkleuren; voor het beste resultaat laat u de gel een nacht ontkleuren)

De drie belangrijkste stappen van het practicum – PCR, gelelektroforese en kleuren – duren elk minimaal een uur. Hou hier bij het plannen van het practicum rekening mee. U kunt er voor kiezen om leerlingen in drie opeenvolgende lessen (al dan niet verspreid over verschillende dagen) alle handelingen zelf te laten verrichten. U kunt er ook voor kiezen om bepaalde stappen in het practicum zelf of met uw TOA uit te voeren. De voorbereidende les kan vooraf als huiswerk gegeven worden, maar er is tijdens de ‘wachtijd’ in het practicum ook ruimte voor leerlingen om aan de opdrachten te werken. Een planning zou er bijvoorbeeld als volgt uit kunnen zien:

Tabel 2. Voorbeeld lesplanning van het practicum forensisch DNA-onderzoek.

vooraf:	leerlingen maken de voorbereidende les als huiswerk, de docent en/of TOA bereidt het practicum voor
les 1:	leerlingen voeren het eerste deel van het practicum uit (pipetteren en PCR inzetten), de docent en/of TOA pipetteert de gel loading solution in de epjes
les 2:	leerlingen voeren het tweede deel van het practicum uit (inzetten gelelektroforese)
na les 2:	de docent en/of TOA kleuren en ontkleuren de gels
les 3:	verwerking van de resultaten en nabespreking

De planning hierboven dient slechts als voorbeeld. Natuurlijk kunt u uw eigen planning precies aanpassen aan de situatie in de klas en op school.

#### voorbereiding

Hou bij de voorbereiding van de lessen rekening met het volgende:

- Lees zelf voorafgaand aan de lessen de handleiding(en) een keer door.
- Kopieer het lesmateriaal voor de leerlingen:
  - de voorbereidende les (voor iedere leerling één exemplaar)
  - de practicumhandleiding (voor iedere leerling één exemplaar, of in ieder geval één exemplaar per groepje)
  - de handleiding instrumenten (enkele exemplaren per klas)
- Zorg voor een lokaal met computer, beamer en internet als u de voorbereidende les in de klas uitvoert.
- Voor het practicum heeft u, behalve de inhoud van de meegeleverde kit, de volgende materialen nodig:
  - wegwerphandschoenen
  - markeerstiften om de epjes te labelen (stiften om cd's te beschrijven zijn hiervoor erg geschikt)

- een stopwatch
- 2 liter gedestilleerd water
- Zet de Dyna Chill koelers een dag van tevoren in het vriesvak.
- Bereid het practicum voor (zie verderop in deze handleiding).

#### *na gebruik van de kist*

U wordt verzocht om na gebruik van de leskist te controleren of alle onderdelen aanwezig en op de juiste plaats opgeborgen zijn. Raadpleeg hiervoor de checklist verderop in deze handleiding.

#### *gebruik van de leskist zonder dit practicum*

De apparatuur in de practicumset DNA (onderdeel van de leskist DNA) is natuurlijk ook te gebruiken voor andere activiteiten dan het practicum genexpressie. Kijk bijvoorbeeld op [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) of [www.edvotek.com](http://www.edvotek.com) voor het bestellen van kits en andere verbruiksmaterialen.

#### *veiligheid*

Het is niet strikt noodzakelijk om tijdens het uitvoeren van dit practicum handschoenen te dragen. Om leerlingen te trainen om (uit voorzorg) altijd de nodige veiligheidsvoorschriften in acht te nemen, raden wij aan om hen ook tijdens het pipetteren een wegwerphandschoen te laten dragen aan de hand die niet de pipet vasthoudt (meestal de linkerhand).

#### *de kit*

Bij dit practicum wordt gebruik gemaakt van de practicumkit *PCR-based DNA Fingerprinting* van Edvotek (catalogusnummer #371). Let er op dat sommige onderdelen van de kit tot gebruik in het vriesvak bewaard moeten worden.

## VOORBEREIDING PRACTICUM

In dit hoofdstuk staat welke handelingen er verricht moeten worden ter voorbereiding op het practicum. U kunt maximaal vijf groepjes tegelijk aan het practicum laten werken. In de beschrijving hieronder wordt uitgegaan van het maximale aantal. Als u met minder groepjes werkt kunnen de aantallen en hoeveelheden aangepast worden.

### *de gelelektroforesebuffer*

1. Maak de elektroforesebuffer (Tris-acetate-EDTA) van tevoren. Voor 2 liter buffer moet 40 ml van de meegeleverde, geconcentreerde (50x) buffer worden gemengd met 1960 ml gedestilleerd water. De buffer kan op kamertemperatuur bewaard worden.

### *de agarose gels*

2. Het is de bedoeling dat u zelf de gels giet die bij dit practicum gebruikt worden. De leskist bevat vier elektroforesetanks. U zult daarom in ieder geval één gel moeten gieten die niet één, maar twee rijen slotjes heeft. Op die gel kunnen dus twee groepjes hun monsters laden.

3. De gels worden rechtstreeks gegoten in de plastic gelhouders die in de elektroforesetanks zitten. De houders zijn aan de voor- en achterzijde open. Plak de voor- en achterzijde dicht met een stukje tape. Zorg dat de tape aan de zijkanten en onderkant goed vast zit. Als het goed is, is nu een bakje ontstaan waarin je de gel kan gieten.

4. Plaats een kam op de houder om de uitsparingen van de slotjes te maken: in ieder geval een kam aan een uiteinde, en (voor één gel) een kam halverwege de houder.

5. Weeg 2,0 g (UltraSpec) agarose af.

6. Meng in een maatbeker of erlenmeyer 200 ml (verdunde) elektroforesebuffer met de agarose. Markeer met een stift het vloeistofstofdiveau aan de buitenzijde van de beker.

7. Het mengsel moet nu verwarmd worden totdat een heldere vloeistof is ontstaan waarin geen agarosekristallen meer te zien zijn. Dat kan op twee manieren, in de magnetron of op een kookplaat.

*magnetron.* Dek de beker af met magnetronfolie om verdamping te voorkomen. Verwarm de agarose in de magnetron, waarbij u om de 30 seconden de beker uit de magnetron haalt om even te roeren of te zwenken.

*kookplaat.* Dek de beker af met aluminiumfolie om verdamping te voorkomen. Verwarm de agarose onder regelmatig roeren.

8. Laat de agaroseoplossing afkoelen tot een temperatuur van 60°C. Als het vloeistofdiveau toch gezakt is (zie de markering), vul dan aan tot het oorspronkelijke volume met gedestilleerd water. Let op: giet nooit kokend hete agarose in de houders, want hierdoor raken ze beschadigd.

9. Plaats de houder(s) met tape en kammen op een recht oppervlak.

10. Giet de agarose nu in de houder(s). De agarose moet een laagje vormen van 5 tot 7 mm hoog.

11. Laat de gel minstens 20 minuten afkoelen.

12. Verwijder heel voorzichtig de kammen en de tape.

#### *de monsters*

13. Label met een markeerstift voor ieder groepje vijf epjes (0,5 ml) met de volgende afkortingen: PD, SL, V1, V2 en V3.
14. De kit wordt geleverd met vier verschillende DNA-templates. Dit worden de monsters van het slachtoffer (SL) en de drie verdachten (V1 t/m V3). U mag zelf bepalen welke template u voor welk monster gebruikt. Maak de verdeling wel hetzelfde voor alle groepjes.
15. Pipetteer voor elk groepje 6  $\mu$ l van elk monster in de juiste, gelabelde epjes. Gebruik voor elk monster een nieuwe pipetpunt.
16. Gebruik één van de templates (u mag zelf kiezen welke) voor het monster dat gevonden is op de plaats delict (PD). Let op: hiermee bepaalt u dus welke match (tussen het spoor en de donor) de leerlingen zullen vinden. Pipetteer weer 6  $\mu$ l van dit monster in de juiste epjes.
17. Leg de epjes na het pipetteren terug in het vriesvak totdat ze gebruikt worden. Tijdens het practicum in het klaslokaal kunt u de epjes in de (van tevoren gekoelde) Dyna Chill koeler houden.

#### *primer mix en PCR-epjes*

18. Per groepje is ongeveer 110  $\mu$ l primer mix nodig. Label vijf epjes met de afkorting MX. Pipetteer voor ieder groepje 110  $\mu$ l primer mix.
19. Let op: primer mix moet bewaard worden bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tijdens het practicum, in het lokaal, kunt u hier de Dyna Chill koelers voor gebruiken.
20. Het PCR-apparaat dat bij de leskist zit biedt alleen plaats aan kleine PCR-epjes (0,2 ml). Geef ieder groepje vijf van deze epjes, en zorg dat ieder epje een witte 'PRC-korrel' bevat (breng de korrels indien nodig over van de grotere in de kleine epjes).
21. Het is handig om alle epjes voor één groepje tijdelijk in een plastic zakje te bewaren.

#### *gel loading solution*

22. Na de PCR moet in alle epjes 5  $\mu$ l gel loading solution gepipetteerd worden. Als u er voor kiest om dit de leerlingen zelf te laten doen is het handig om per groepje 30  $\mu$ l gel loading solution in een epje te pipetteren. Als u deze stap zelf uitvoert is dat niet nodig. U moet de gel loading solution wel bewaren bij  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *DNA-ladder*

23. Bij het laden van de monsters op de gel wordt ter controle in één slotje ook een DNA-ladder geladen. Pipetteer voor elk groepje 30  $\mu$ l DNA-ladder in een epje. De DNA-ladder moet bewaard worden bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tijdens het practicum, in het lokaal, kunt u hier de Dyna Chill koelers voor gebruiken.

#### *kleuring*

24. Raadpleeg de instructies bij de kit voor gebruik van de kleurvloeistof. (Het verschilt soms per levering welke kleuring precies in de kit zit).

## AANDACHTSPUNTEN TIJDENS HET PRACTICUM

1. Plaats alle apparatuur op een handige, het liefst centrale, plek in het lokaal. U kunt er voor kiezen om de gels zelf in de tanks te doen en de tanks te vullen, of om dit samen met de leerlingen te doen. In de handleiding instrumenten wordt uitgelegd hoe dit in zijn werk gaat.
2. Laat leerlingen van te voren even oefenen met de micropipet. Vertel in ieder geval...
  - dat je de pipet nooit mag gebruiken zonder pipetpunt
  - dat een micropipet bij het indrukken twee 'stops' heeft (laat ze dit voelen)
  - dat je bij het opzuigen van vloeistof de pipet tot de eerste stop moet indrukken, en dan – als de pipet in de vloeistof zit – de knop langzaam moet laten opkomen
  - dat je bij het uitpipetteren de knop helemaal moet indrukken tot de tweede stop.
3. Na de PCR en na het pipetteren van de gel loading solution kunnen de monsters tijdelijk bewaard worden in het vriesvak.
4. Voordat de monsters en de DNA-ladder op de gel geladen kunnen worden moeten ze eerst twee minuten verwarmd worden. Hier kunt u een warmwaterbad voor gebruiken.
5. Begeleid de leerlingen in het begin bij het laden van de gel met de micropipet. Het is handig als ze hun 'pipetteerarm' ondersteunen met de andere arm.
6. Zie de leerlingenhandleiding voor de instructies voor het kleuren en ontkleuren van de gels.
7. Gebruik de lichtbak en de zwarte kap voor het maken van foto's van de gels. U kunt hiervoor de meegeleverde camera gebruiken, maar u kunt natuurlijk ook uw eigen toestel gebruiken.

# ANTWOORDEN

## VOORBEREIDENDE LES

2. In de checklist voor de crime scene investigators moeten in ieder geval de volgende elementen aanwezig zijn:

- Een verklaring waarom DNA tegelijkertijd als universeel en specifiek beschouwd kan worden. Bijvoorbeeld:  
Alle organismen hebben DNA. DNA is een stof die aanwezig is in alle cellen van een organisme. DNA bevat alle erfelijke informatie van een organisme. Het is in deze opzichten universeel. Tegelijkertijd is de precieze nucleotidenvolgorde van het DNA bij ieder mens anders (behalve bij eeniige tweelingen).
- Alle sporen die cellen bevatten zijn geschikt voor het maken van een DNA-profiel. Er zijn maar enkele cellen nodig voor het maken van een profiel. Geschikte sporen zijn: bloed, sperma, haarwortels, speeksel en vaak ook urine.
- Het DNA van de crime scene investigators mag niet in de sporen terecht komen. De onderzoekers moeten daarom mondkapjes en beschermende overalls dragen.
- Biologisch sporenmateriaal kan het beste koud gehouden worden (ook tijdens vervoer).

3. DNA-polymerase is een enzym dat langs een enkelstrengs DNA-molecuul beweegt en zorgt voor de vorming van de complementaire keten.

Nucleotiden zijn de bouwstenen waar DNA uit gevormd wordt.

Primers zijn korte fragmenten enkelstrengs DNA die aan een (lange) DNA-streng binden, net vóór of net na het stukje DNA waarin men geïnteresseerd is.

4. Nucleotiden en primers kunnen op raken. Polymerase wordt bij PCR niet verbruikt.

5. Na 35 cycli zijn  $2^{35}$  DNA-moleculen aanwezig.

6. Je moet steeds een schoon pipetpuntje gebruiken omdat er anders restjes van het vorige monster in je nieuwe monster terecht komen. Daar kunnen ook DNA-moleculen in voorkomen, die dan weer door PCR worden gekopieerd.

7. Korte nucleotidenketens bewegen het snelst door de gel.

8. DNA is zelf negatief geladen (onder andere door de fosfaatgroepen in de backbone).

9. [ter beoordeling aan de docent]

10. Als je de elektroforese langer dan de aangegeven tijd laat lopen, dan komen alle DNA-fragmenten onderin de gel terecht, of 'lopen' er van af.

11. Als je de elektroforese korter laat lopen dan liggen de bandjes op de gel dichter bij elkaar. Het is dan lastiger om de verschillen te zien.

12. Als je de elektrodes van het elektroforeseapparaat zou omdraaien dan zouden de DNA-fragmenten de andere kant op bewegen en al snel van de gel aflopen.

13. Analyses van biologische sporen worden vaak meerdere keren uitgevoerd om fouten uit te sluiten.



## HET PRACTICUM: RESULTATEN

6. Als het goed is, is er een match tussen het spoor dat is gevonden op de plaats delict, en één van de andere monsters.
7. De negatieve pool bevond zich aan de kant waar de slotjes zitten, en de positieve pool aan de andere zijde. De kleinste fragmenten bevinden zich in de bandjes die het verst van de slotjes af liggen.

## HET PRACTICUM: VERWERKING

1. In het rapport aan de officier van justitie moeten in ieder geval de volgende elementen aanwezig zijn:
  - Het bloedspoor bevatte bruikbaar celmateriaal.
  - Het is gelukt om een DNA-profiel te verkrijgen uit het spoor (als het practicum is geslaagd tenminste).
  - Er is sprake van een match tussen het DNA-profiel van het bloedspoor en het DNA-profiel van één van de verdachten (of het slachtoffer).
  - De gevonden match betekent niet dat de verdachte schuldig is aan het misdrijf, want:
    - Het valt niet uit te sluiten dat er andere personen bestaan die het zelfde DNA-profiel hebben. Zelfs een 'normaal' DNA-profiel, dat uit 12 verschillende loci bestaat, biedt hierin geen absolute zekerheid.
    - Zelfs al is een verdachte de donor van een (bloed)spoor, dan is het nog niet zeker dat hij of zij schuldig is aan het misdrijf.
2. [ter beoordeling aan de docent] In een (klassikale) discussie zou in ieder geval aan de orde moeten komen dat DNA-onderzoekers op het NFI, en aanverwante instellingen, in ieder geval zo veel mogelijk werken met anonieme monsters. Een interessante vraag is of de leerlingen van tevoren verwachtingen hadden over een mogelijke match op basis van de casusbeschrijving of de getuigenverklaringen.

## CHECKLIST INHOUD KISTEN

Hieronder vind u een overzicht van de inhoud van de practicumset, verdeeld over de vijf kisten. U wordt verzocht om na gebruik van de leskist nauwkeurig te controleren of alle materialen aanwezig en op de juiste plaats opgeborgen zijn.

### Kist 1. PCR-apparaat

- PCR-apparaat, inclusief snoer (1x)

### Kist 2. Gelelektroforese

- voeding, inclusief snoer (1x)
- horizontale elektroforesetank, inclusief deksel (4x)
- gelhouder, inclusief kam (4x)
- microcentrifuge, inclusief snoer (4x)
- zwart opzetstuk voor kleine epjes (4x)
- grijs cilindertje voor epjes (24x)

### Kist 3. Pipetten en epjes

- micropipet (14x)
- pipetrek (2x)
- epjeshouder (groen) (10x)
- epjeshouder (felgekleurd) (5x)
- doos pipetpuntjes (geel) (2x)
- doos pipetpuntjes (blauw) (1x)
- Dyna Chill koeler (2x)

### Kist 4. Lichtbak en camera

- lichtbak, inclusief snoer (1x)
- fototoestel, inclusief USB-kabel (1x)
- zwarte kap (1x)

### Kist 5. Schudplatform

- schudplatform, inclusief snoer (1x)
- extra plateau voor schudplatform (1x)
- cilinder voor bevestiging van extra plateau (4x)
- plastic bakje (8x)

## COLOFON

Het lesmateriaal bij de leskist DNA is ontwikkeld door De Praktijk in opdracht van de Faculteit der Natuurwetenschappen, Wiskunde en Informatica (FNWI) van de Universiteit van Amsterdam (UvA).

Op dit lesmateriaal is de Creative Commons Naamsvermelding-NietCommercieel-GelijkDelen 3.0 Nederland Licentie van toepassing (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl>). Het beheer van de leskist is in handen van Itsacademy (<http://www.itsacademy.nl/vakgebieden/biologie/leskisten/>). Met vragen en/of opmerkingen kan contact worden opgenomen met Bart Groeneveld ([a.groeneveld@uva.nl](mailto:a.groeneveld@uva.nl)), of De Praktijk ([info@praktijk.nu](mailto:info@praktijk.nu), 020 747 01 66, [www.praktijk.nu](http://www.praktijk.nu)).

**CC BY-NC-SA 2013 – De Praktijk i.o.v. FNWI, UvA**