

Isolation von forensischen Proben:

In diesem Arbeitsschritt wird nun aus der forensischen Probe DNA extrahiert. Leider kann man diesen Schritt nicht von dem Roboter ausführen lassen, wie man das bei den Wattetupfern getan hat. Dies liegt daran, dass jede Probe anders aufbereitet wird. So müsste man für jede Probe ein anderes Arbeitsprotokoll anfertigen.

Da die Probe erhebliche Mengen an nicht benötigten Zellbestandteilen wie Proteinen enthält, muss sie nun Schritt für Schritt davon befreit werden. Der Entzug von beispielsweise Proteinen wird durch das Hinzufügen von Proteinase K eingeleitet. Wie Sie sich vielleicht erinnern können, kam das Enzym schon bei der DNA Extraktion mit einem Roboter vor. Auch in diesem Fall, hat die Proteinase die gleiche Funktion, nämlich den Abbau von Proteinen aus der Zellauslösung.

Es gibt verschiedene Methoden, mit denen man die restlichen Verunreinigungen entfernen kann, sodass DNA schließlich in reiner Form übrig bleibt.

Als eine einfache und schnelle Variante bietet sich das sogenannte Silica Adsorptionsverfahren an. DNA wird von einer Silicagel-Membran aufgefangen. Puffer im Lyse-Prozess sorgen dafür, dass nur die DNA adsorbiert wird, während Fremdstoffe in Lösung bleiben und ausgewaschen werden.

Um das Endprodukt, die reine DNA, aus dem Zellauszug zu erhalten, muss man einige Reaktionsschritte durchführen. Wie beispielsweise: das Mischen !!hier im Bild!!, das Inkubieren in einem Wärmeschrank und das Zentrifugieren mit einer Zentrifuge. Das Inkubieren der Proben erfolgt 2 mal, das erste mal bei 56 °C für mindestens 3 Stunden oder am Besten über Nacht und das zweite mal für 10 Minuten bei 70°C.

Wie Sie nun erkennen können, kommt zu der Probe noch Ethanol hinzu. Bei einer Konzentration von 96%igen Ethanol können DNA Moleküle nicht in gelöster Form existieren und fallen aus. Das Ethanol erleichtert so das Binden der DNA an die Silicamembran.

Hier können Sie gerade sehen, wie die ausgefällte DNA in ein neues Eppendorfgefäß, welches eine Silicamembran enthält, pipettiert wird.

Während sich also die DNA an die Silica heftet, laufen die Verunreinigungen und die sonstigen Zellorganellen hindurch und binden nicht an die Membran, wobei immer wieder der Wasch-Puffer hinzugefügt wird. Anschließend wird die Probe zentrifugiert, sodass der Überstand verworfen werden kann. Den gesamten Vorgang bezeichnet man als Waschung der nicht benötigten Zellbestandteile.

Nach dem Auswaschen der letzten unerwünschten Substanz, wird der sogenannte „Elutions Puffer“ in die Probenlösung pipettiert, mit dem man schließlich DNA gewinnt, indem die Wechselwirkungen zwischen den DNA-Molekülen und dem Silica destabilisiert werden. DNA wird also wieder von der Membran abgelöst.

Nun ist die DNA vollständig extrahiert. Anschließend werden bestimmte DNA-Abschnitte vermehrt, damit man genügend DNA für die Sequenzierung zur Verfügung hat. Die Vermehrung erfolgt durch die sogenannte Polymerasekettenreaktion oder kurz PCR. Falls die PCR nicht sofort begonnen werden kann, kommen die DNA-Proben in einen Kühlschrank.

UNTERTITEL im Film

Jetzt erfolgt die Extraktion der forensischen Proben.

Die Probe muss nun Schritt für Schritt von unnötigen Zellbestandteilen befreit werden, damit am Ende die reine DNA übrig bleibt.

Die Proben kommen für mindestens 3 Stunden in den Wärmeschrank.

Wir verwenden hierzu das Silica-Adsorptionsverfahren an.

Vorgehensweise:

In die Zelllösung wird immer wieder Puffern pipettiert. Dabei bindet DNA an die Silicamembran, wobei die restlichen Zellbestandteile hindurchlaufen. Anschließend wird die Probe zentrifugiert, sodass der Überstand verworfen werden kann.

Die Proben kommen für 10 Minuten in den Wärmeschrank.

Durch das Hinzufügen von Ethanol wird die DNA ausgefällt.

Die ausgefällte DNA wird in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert.

Die Gewinnung der DNA erfolgt durch die Zugabe eines Elutions-Puffers, der die Wechselwirkungen zwischen den DNA Molekülen und dem Silicamembran destabilisiert.

Schließlich werden bestimmte DNA Abschnitte vermehrt.