



SIMULATIE VAN EEN DNA-VADERSCHAPSTEST

Dit materiaal werd ontwikkeld door

Prof. em. Patrick Reygel



Je mag dit werk kopiëren, verspreiden, gebruiken en uitvoeren, en afgeleide werken maken, onder de voorwaarden:

- *vermelden van UHasselt en de auteurs*
 - *voor niet-commerciële doeleinden*
 - *verspreiden onder dezelfde licentie*

Simulatie van een DNA-vaderschapstest

Concreet voorbeeld

(Art. Lode Ramaekers Het belang van Limburg do. 24/01/02)

Manu (fictieve naam) wil zekerheid, klaarheid over het biologische vaderschap van het kind van zijn vrouw.

"Mijn vrouw is vier jaar jonger dan ik. We kennen mekaar bijna 25 jaar: 10 jaar gevrijd, 14 jaar getrouwd (geweest, zeg maar). In de eerste helft van vorig jaar leerde ze een vriend kennen en ze had met die man een 'slippertje'. Van die éné keer werd ze zwanger, zei ze zelf, achteraf. Dat bleek - voor haar - al heel gauw, maar aanvankelijk wist ik daar niks van. We verlangden allebei naar een kleintje en we deden ons best om er eentje te krijgen. We zijn nog samen met vakantie geweest, maar 14 dagen daarna heeft zij mij verlaten. Ze is gaan samenwonen met die 'vriend' die haar naar eigen zeggen zwanger gemaakt heeft, daar is ze voor 100 procent zeker van.

Ik blijf met twijfels zitten: in die periode hadden we nog betrekkingen met mekaar. De gynaecoloog mag dan wel zeggen dat de bevruchting einde april plaats gehad heeft, juist in de periode van dat slippertje, maar gynaecologen zitten er ook wel eens naast en ik sluit niet uit dat ik de biologische vader ben. Hoe dan ook, we zijn een scheidingsprocedure met onderlinge toestemming gestart en begin januari zijn we voor de eerste keer naar de rechtbank geweest. Die procedure is nu weer opgeschort, want ik wil eerst en vooral die kwestie met dat kind van de baan. Als ik de vader blijk te zijn dan wil ik mijn rechten - hoederecht, bezoekrechten en zo - en ik wil er ook voor betalen. Is de huidige vriend van mijn vrouw de biologische vader, dan scheiden we toch gewoon en moet ze maar roeien met de riemen van nu. Dan hoeft het kind mijn naam niet (meer) te dragen en draai ik ook niet op voor de kosten. De jongste tijd zit ik mij vragen te stellen: stel dat ik mij te pletter rijd, dan gaat mijn hebben en houden naar een kind dat misschien helemaal niet van mij is. Zinloos toch! Daarom wil ik klaarheid door zo'n test "

DNA-polymorfisme als principe achter de genetische "vingerafdruk"

De genetische informatie in de kern van elke cel van één individu is volledig identiek. Vertrekkend bij de bevruchte eicel werd immers bij elke celdeling het volledige DNA van de chromosomen gerepliceerd.

Daarentegen is de genetische variatie tussen individuen zeer groot. De drijvende kracht achter deze variatie zijn spontane mutaties. Indien deze mutaties ontstaan in geslachtscellen dan worden deze veranderingen tijdens de voortplanting op de volgende generaties overgebracht. Zo ontstaan bij elke mutatie twee varianten in de populatie van het desbetreffende stukje DNA. Zulke variatie in DNA-sequenties noemt men DNA-polymorfismen.

Men kan DNA indelen in coderend DNA en niet-coderend DNA. Het coderende DNA omvat de genen, die instaan voor de goede synthese van lichaamseiwitten en enzymen. Een mutatie in zo een gen kan makkelijk leiden tot inbouw van een verkeerd aminozuur en dus tot een abnormale structuur van het eiwit. Vele van dergelijke mutanten zijn niet levensvatbaar. Mutaties in niet-coderende gedeelten van het DNA vormen echter geen bedreiging voor de levensvatbaarheid of het vermogen tot voortplanten. Het is dan ook niet verwonderlijk dat de variatie in het niet-coderende DNA 10 keer groter is dan in het coderend deel. Omdat door geslachtelijke voortplanting bij elke generatie terug een vermenging optreedt van het DNA van twee individuen is er in de loop van de menselijke geschiedenis een eindeloze genetische verscheidenheid tot stand gekomen. Enkel eeneiige tweelingen hebben een volledige identieke volgorde van basenparen in hun DNA. De DNA-frequentie is voor elk individu net zo uniek als zijn vingerafdruk. Het komt er dus op neer deze variatie op de ene of ander manier zichtbaar te maken.

Niet gans het genoom is nodig voor een genetische vingerafdruk

Ongeveer 40 procent van het niet-coderende DNA bestaat uit zogenaamd repetitief DNA. Dat zijn korte DNA-sequenties van maximaal 60 basenparen lang die ettelijke keren herhaald worden. Zeer korte repetitieve sequenties (2 tot 10) worden STR's (Short Tandem Repeats) genoemd. Als men de zo een repetitieve zone onderzoekt en vergelijkt bij verschillende individuen dan blijkt het aantal herhalingen zeer sterk te variëren. Deze STR-zones blijken immers erg mutatiegevoelig te zijn en dat verklaart de grote variatie die in de loop der tijden ontstaan is in de populatie. De verschillende varianten die zo ontstaan zijn noemt men ook VNTR's (Various Number of Tandem Repeats). Dankzij deze grote variatie vormen de VNTR-loci de aangewezen plaatsen om individuele verschillen te herkennen. Bij het maken van een genetische vingerafdruk moeten maar enkele van dergelijke zones onderzocht worden om een kenmerkend patroon voor een individu te bekomen.

De PCR-techniek

Simulatie

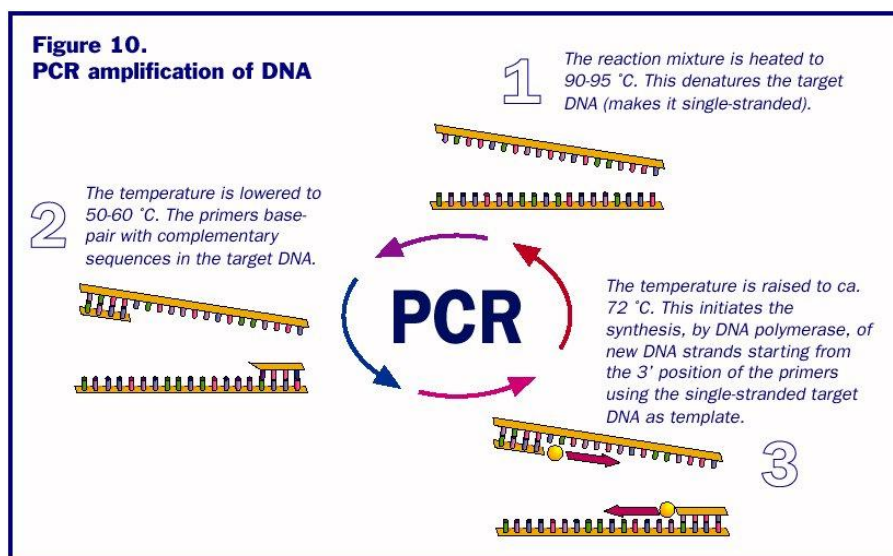
Elk groepje krijgt telkens 4 keer 2 DNA-sequenties (telkens 2 sequenties voor de moeder, het kind, de echtgenoot en de vriend). Om deze sequenties aan elke groep te kunnen uitdelen heeft de leerkracht het oorspronkelijke werkblad moeten fotokopiëren.

Ook in werkelijkheid moeten de interessante repetitieve zones uit het DNA vermenigvuldigd worden. Bij forensisch (= gerechtelijk) DNA-onderzoek volstaan enkele cellen uit speeksel op een sigarettenpeuk of uit wortelmateriaal van één enkele haar. Voor vaderschapstesten neemt men wat schraapsel van de wang. De methode om van dit kleine beetje DNA voldoende testmateriaal te bekomen heet de **PCR-techniek**.

De PCR-techniek of Polymerase Chain Reaction berust eigenlijk op de werking van een enzym dat wij kennen van de replicatie van DNA: het DNA-polymerase. Dit enzym plaatst tijdens de replicatie tegenover elke base van een geopende enkelstrengige DNA-keten de complementaire base. Vanaf 1988 kon men dit enzym in een werkbare vorm afzonderen, zodat replicatie in vitro (= "in glas" = buiten de levende cel) mogelijk werd. Daarna werd dit proces zodanig geautomatiseerd, dat er in een herhaalde cyclus van drie stappen telkens opnieuw een verdubbeling van het gewenste DNA plaatsgrijpt.

- Eerste stap Het dubbelstrengig DNA wordt door de temperatuur op te drijven tot 90-95 °C gescheiden in twee complementaire, enkele strengen.
- Tweede stap Er worden zogenaamde 'primers' toegevoegd. Dit zijn 2 korte DNA'stukjes (20-30 basen lang) die complementair zijn met een sequentie die zich net voor en achter de te onderzoeken STR-regio's bevinden. Dan wordt afgekoeld tot 50-60°C. Bij deze temperatuur binden de primers zich op de complementaire sequenties van de aanwezige strengen.
- Derde stap Door de temperatuur terug te verhogen tot 72°C begint het polymerase een complementaire streng aan te bouwen, vertrekkend van de aanwezige primers.

Deze drie stappen worden zo een 25 tot 35 keer herhaald totdat men voldoende DNA - onderzoeksmateriaal bekomen heeft.



Figuur: "Unit 2: DNA Profiling van EIBE <http://www.rdg.ac.uk/EIBE/home.html>"

De werking van restrictie-enzymen

Simulatie

Knip eerst voor de vier personen de twee dubbelstrengen (behorende tot 2 homologe chromosomen) uit.

Zoek in de bovenste van elke DNA-sequentie de voorkomende GGCC-tandems en arceer of onderlijn ze.

Knip daarna de dubbelstrengen op de gemerkte plaatsen door tussen de tweede G en de eerste C. Knip van voor en van achter ook de 5'- en 3'- karakters weg.

Op deze manier werken ook de restrictie-enzymen.

Je hebt nu de werking van een restrictie-enzym gesimuleerd. Restrictie-enzymen vormen verweermiddelen van bacteriën tegen binnendringende virussen. Deze enzymen kappen het virale DNA in stukjes zodat het onschadelijk gemaakt wordt. Restrictie-enzymen zoeken naar een specifieke sequentie in het DNA en breken binnen die frequentie het DNA doormidden.

Er zijn vele restrictie-enzymen bekend, elk met hun eigen herkenningsequentie en knippatroon. Dit zijn de meest bekende en de meest gebruikte:

EcoRI - restriction site *GAATTC* na de G

BamHI - restriction site *GGATCC* na de eerste G

HindIII - restriction site *AAGCTT* na de eerste A

HaeIII - restriction site *GGCC* na de tweede G

De eerste cursiefgedrukte letters verwijzen naar de bacteriesoort waarin het enzym aangetroffen wordt.

Opmerkelijk is dat de meeste restrictie-enzymen een palindroom als herkenningsequentie hebben. (De 3'-5'-sequentie van rechts naar links is gelijk aan de 5'-3'-sequentie van links naar rechts)

5'-...GAATTC...-3'
3'-...CTTAAG...-5'

5'-...GGCC...-3'
3'-...CCGG...-5'

5'-...AAGCTT...-3'
3'-...TTCGAA...-5'

Door restrictie-enzymen te gebruiken wordt het DNA dat via PCR-techniek bekomen was in welbepaalde fragmenten gekapt. Door het voorkomen van de verschillen in het aantal STR's zal de lengte van die fragmenten echter variëren van individu tot individu. Bij het kind zal voor elk fragment echter een even lang fragment aangetroffen worden bij één van zijn twee ouders.

Gelelektroforese

Simulatie

Voor elk individu vind je ook een werkblad met een rooster.

Rangschik nu per individu de bekomen fragmenten **van klein naar groot**.

In werkelijkheid worden de DNA-fragmenten ook op die manier gerangschikt door **gelelektroforese**. Schrijf naast elk fragment de lengte in basenparen.

Door het gebruik van restrictie-enzymen is het DNA nu verdeeld in fragmenten van verschillende lengte. Door voor elk individu nu de stukjes per lengte te rangschikken kan gekeken worden welke fragmenten bij het kind overeen stemmen met fragmenten bij de moeder en welke afkomstig kunnen zijn van één van de twee potentiële vaders. Bij forensisch onderzoek en bij vaderschapsbepaling gebruikt men daarvoor de techniek van gelelektroforese. Men maakt een gel en in die gel brengt men sleuven aan. Na inwerking van de restrictie-enzymen brengt men het DNA van elk individu over in één van de sleuven. Er wordt ook een referentiestaal (bestaande uit DNA-fragmenten van gekende lengte) aangebracht in een andere sleuf. Dan wordt de gel in een elektrisch veld gebracht. Door de fosfaatgroepen in het DNA zijn de fragmenten negatief geladen. Zij zullen dus beginnen te migreren naar de positieve pool. Grote fragmenten worden echter sterker gehinderd door de gel dan kleine fragmenten. De kleinste fragmenten migreren dus sneller en zo worden de door restrictie bekomen DNA-fragmenten mooi gesorteerd volgens hun lengte. Men moet dan enkel de fragmenten nog zichtbaar maken. Oorspronkelijk gebeurde dat met radioactieve merkers. In de moderne techniek brengt een computergestuurde laserstraal de banden op een scherm. (Tijdens het practicum zullen wij echter een kleurstof gebruiken).

Wie is nu de vader?

Simulatie

Vergelijk eerst het patroon van het kind met dat van de moeder.

Elimineer nu de fragmenten die beiden gemeenschappelijk hebben.

Zoek daarna bij welke van de twee potentiële vaders de overblijvende strookjes van het kind voorkomen.

Wat is je besluit?

Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1 Moeder1
5'-gtgctctgacggccctgccagcagcagcagcagctacgaaaaggccgaaccgcgttggctagaacgacgaatcagcagcggccgatttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagactgccgggacggtcgtcgtcgtcgtcatgctttccggcttggcgcaaccgatcttgctgcttagtcgtcgtcggcgttaaattgaaactgcgaag-5'

Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2 Moeder2
5'-gtgctctgacgagtctgccagcagggccagcagctacgaaaaaacggaccgcgttggctagggccacgaatcagcagcagcaggtttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagactgctcagacggtcgtcccggtcgtcatgcttttttgcctggcgcaaccgatcccggtgcttagtcgtcgtcgtccaaattgaaactgcgaag-5'

Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1 Kind 1
5'-gtgctctgacgagggccccagcagcagcagcagctacgaaaaggccgaaccgcgttggctagaacgacgaatcagcagcagcggccttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagagtgtcccggggtcgtcgtcgtcgtcatgctttccggcttggcgcaaccgatcttgctgcttagtcgtcgtcggcgaattgaaactgcgaag-5'

Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2 Kind 2
5'-gtgctctgacgagtctgccagcagggccagcagctacgaaaaaacggaccgcgttggctagggccacgaatcagcagcagcaggtttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagactgctcagacggtcgtcccggtcgtcatgcttttttgcctggcgcaaccgatcccggtgcttagtcgtcgtcgtccaaattgaaactgcgaag-5'

Echtgenoot1 Echtgenoot1 Echtgenoot1 Echtgenoot1 Echtgenoot1 Echtgenoot1 Echtgenoot1 Echtgenoot1
5'-gtgctctgacgagtctgcggccagcagcagcagctacgaaaaaacggaccagaggcctggctagaacgacgaatcagcagcagcaggtttaactttgacg-3'
3'-cacgagactgctcagacgccggtcgtcgtcgtcgtcatgcttttttgcctgggtctccggaccgatcttgctgcttagtcgtcgtcgtccaaattgaaactgc-5'

Echtgenoot2 Echtgenoot2 Echtgenoot2 Echtgenoot2 Echtgenoot2 Echtgenoot2 Echtgenoot2 Echtgenoot2
5'-gtgctctggccagtctgccagcagcagcagcagctacgaaaaggccgaaccgcgttggctagaacgacgaatcagcggccgcaggtttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagaccggtcagacggtcgtcgtcgtcgtcatgctttccggcttggcgcaaccgatcttgctgcttagtcgccggcgtccaaattgaaactgcgaag-5'

Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1 Vriend1
5'-gtgctctgacgagtctgggcccagcagcagcagctacgaaaaggccgaaccgcgttggctagaacgacgaatcagggccagcaggtttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagactgctcagaccgggtcgtcgtcgtcgtcatgctttccggcttggcgcaaccgatcttgctgcttagtcccggtcgtccaaattgaaactgcgaag-5'

Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2 Vriend2
5'-gtgctctgacgagggccccagcagcagcagcagctacgaaaaggccgaaccgcgttggctagaacgacgaatcagcagcagcggccttaactttgacgcttc-3'
3'-cacgagagtgtcccggggtcgtcgtcgtcgtcatgctttccggcttggcgcaaccgatcttgctgcttagtcgtcgtcggcgaattgaaactgcgaag-5'

Moeder

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						

Kind

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						

Echtgenoot

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						

Vriend

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						