

Abklärung strittiger Identität von Blutalkoholproben mit DNA-Fingerprinting

W. Bär und A. Kratzer

Gerichtlich-Medizinisches Institut der Universität Zürich, Serologie, Postfach, CH-8028 Zürich

Investigating the identity of disputed blood samples using DNA fingerprinting

Summary. DNA fingerprinting is a perfect tool for investigating the identity of disputed blood by alcohol samples extracted. However, blood samples stored at an ambient temperature for longer periods can show considerable degradation of high-molecular DNA, diminishing the value of fingerprint investigation because of loss of the less frequent bands formed by the longer DNA fragments. Addition of the complexing agent EDTA can retard this degradation. Determination of the sex with DNA probes in the blood alcohol sample increases confidence in the investigation.

Key words: Blood alcohol samples, DNA-fingerprinting for identification – Sex determination, DNA-fingerprinting

Zusammenfassung. Bestrittene Identität von Blutalkoholproben kann mit DNA-Fingerprinting zweifelsfrei geklärt werden. Die Aussagekraft kann aber vermindert sein in Fällen mit DNA-Degradation wegen Herumstehens der Blutproben und/oder bei Postversand ohne Kühlung. Zusatz von EDTA verlangsamt generell solche Degradationserscheinungen. Die Geschlechtsbestimmung an Blutalkoholproben mit DNA-Sonden erhöht als einfache Zusatzuntersuchung das Vertrauen in die Abklärungsuntersuchung.

Schlüsselwörter: Identifizierung von Blutproben durch DNA-Fingerprinting – Geschlechtsbestimmung in Blutproben – Blutalkohol, Identifizierung von Blutproben

Einleitung

Obschon bei chemischen Blutalkoholbestimmungen zahlreiche Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Proben-Verwechslungen getroffen werden, wird

Offprint requests to: W. Bär

am Gerichtlich-Medizinischen Institut der Universität Zürich etwa 2–7 Mal pro Jahr ein Auftrag zur Überprüfung der Identität einer Blutalkoholprobe gestellt. Anlaß zu solchen Untersuchungen sind meist auffällige Diskrepanzen zwischen der analytisch bestimmten Blutalkoholkonzentration und den für die meist hohen Alkoholwerte nicht ausreichenden Angaben über die eingenommenen Trinkmengen der Angeschuldigten. Die serologische Merkmalsbestimmung an den tiefgefrorenen aufbewahrten Blutalkoholproben gestattet nach Untersuchung einer Vergleichs-Blutprobe des Probanden eine Aussage zur Frage einer Verwechslung (Oepen, 1968; Zink, 1969; Kleiber, 1987). Bezogen auf 5500 bis 6000 Blutalkoholproben pro Jahr entsprechen diese Identitätsabklärungen am GMI Zürich etwa 0.4 bis 1.2 Promille des untersuchten Materials. Über eine etwa 4- bis 10-fach höhere Häufigkeit solcher Fragestellungen berichtet Kleiber (1987) für Hamburg. In 5% seiner Fälle bestätigen sich die Diskrepanzen. Sie waren aber nie auf Verwechslungen zurückzuführen, vielmehr konnten dabei z. T. recht raffinierte Täuschungsmanöver aufgeklärt werden.

Bei abweichenden Merkmalen in der Vergleichsuntersuchung ist die falsche Identität der Blutprobe bewiesen. Bei Übereinstimmung aller untersuchten Merkmale ist der Angeschuldigte als „Spender“ der Blutprobe nicht auszuschließen. Die Berechnung der Häufigkeit der nachgewiesenen Merkmalskombination in der Normalbevölkerung anhand der bekannten Einzelhäufigkeiten der unabhängigen Merkmale führt, in Analogie zum Vorgehen etwa bei Blutspuren, zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer gegebenenfalls nur zufälligen Übereinstimmung.

Der Nachweis von DNA-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) ist Methode der Wahl zur Dokumentation von genetischer Vielfaltigkeit geworden, da mit ihnen im Vergleich zu den Proteinpolymorphismen eine ca. 10 Mal größere Heterogenität aufgedeckt werden kann. Sogenannte DNA-Minisatellitensonden eignen sich hervorragend zur Aufdeckung von extrem variablen DNA-Polymorphismen (Jeffreys et al., 1985a), da derartige verschiedenen lange, in sich hochpolymorphe Minisatelliten über das gesamte Genom von Mensch und Tier verstreut vorkommen. Bei gewissen (niedrig stringenten) Hybridisierungsbedingungen bilden sich an allen Loci dank der gemeinsamen Tandem-Sequenzen stabile Heteroduplexe. Mit *einer einzigen* DNA-Sonde können somit die Polymorphismen an allen Loci gleichzeitig erfaßt werden. Solche Hybridisierungsmuster werden als *DNA-Fingerprints*, das methodische Verfahren als *DNA-Fingerprinting* bezeichnet.

Die Wahrscheinlichkeit, daß die Fingerprints zweier unverwandter Personen identisch sind, beträgt nach Anwendung einer Minisatelliten-Sonde (für 33.15) nur 3×10^{-11} , bei Kombination von 2 solchen Sonden (für 33.15 und 33.6) lediglich noch 5×10^{-19} (Jeffreys et al., 1985b)! Jeder Mensch – außer monozygoten Zwillingen – besitzt somit ein individuelles Hybridisierungsmuster. DNA-Fingerprints eignen sich deshalb hervorragend zur Unterscheidung von Personen und zellkernhaltigen Spuren, so auch im Rahmen von Identitätsüberprüfungen von Blutalkoholproben.

Zusätzlich kann auf einfache Art und Weise mit geschlechtsspezifischen DNA-Sonden der Geschlechtsnachweis an der Blutalkoholprobe erbracht werden, was immerhin zu einer Verdoppelung des Indiziwertes führt.

Material und Methode

Die untersuchten Blutalkoholproben stammten aus den Jahren 1986 und 1987 und waren somit 2 Monate bis 2 Jahre alt. Nach der Äthanolanalyse lagerten sie bei -20°C und wurden vor der Identitätsabklärung aufgetaut und einer zweiten Äthanolanalyse unterworfen. Anschließend wurden die Blute wieder eingefroren (-20°C) und erst zur DNA-Analyse erneut aufgetaut. Dazu wurden 1–2 ml hämolytisches Blut aus der inkriminierten Blutalkoholprobe über Nacht in 1–2 ml Lyse-Mix bestehend aus 10 mM TRIS-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 8) und 2% SDS, 40 mM DTT, 400 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K bei 37°C inkubiert.

Die DNA-Extraktion wurde durch dreimaliges Ausschütteln für jeweils 10 Min des Überstandes im gleichen Volumen eines 1:1 Gemisches von Methylenchlorid und wassergesättigtem Phenol vorgenommen. Angeschlossen wurde eine vierte Extraktion ausschließlich in Methylenchlorid für wieder 10 Min. Die DNA-Fällung geschah wie üblich durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Azetat pH 5.5 und 2.5 Volumen 100% Äthanol und Tiefgefrieren bei -80°C für mindestens 2 Std. Nach Abzentrifugieren für 10 Min bei 13000 rpm, Verwerfen des Überstandes und Trocknen des Pellets im Vakuum für 30 Minuten, wurde dieses in einer geeigneten Menge TE-Puffer von pH 7.6 aufgelöst. Die DNA aus der EDTA-Vergleichsblutprobe wurde nach Standardmethoden extrahiert. Die Konzentration hochmolekularer DNA wurde vorgängig auf einem Testgel semiquantitativ durch Vergleich mit λ -DNA bekannter Mengen bestimmt.

DNA-Fingerprinting

Je 1 μg DNA wurden mit 24–30 Einheiten des Restriktionsenzym *Hinf* I und des erforderlichen Puffers bei 37°C über Nacht inkubiert, während 48–65 Std in einem 22 cm langen, 1,2% Agarose Gel (SIGMA II A 6877) aufgetrennt und nach Denaturieren und Neutralisieren der DNA mittels Southern-Blotting auf Nitrocellulose Filter übertragen (Schleicher und Schuell, 0,45 μm). Die Sonde 33.15 wurde aus dem M13 Minisatelliten Rekombinanten 33.15 nach Insertpräparation der Replikativen Formen (RF) durch Doppelverdau mit *Eco*RI und *Hind*III gewonnen. Die Markierung mit α - ^{32}P -dCTP (Amersham PB.10205) erfolgte mit dem Random Oligolabeling nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983), wofür der kommerzielle Markierungskit Multiprime System von Amersham (RPN.1601) zur Verfügung stand. Die Southern Blots wurden für 6 Std bei 42°C prähybridisiert und anschließend über Nacht in derselben Lösung zusammengesetzt aus 50 $\mu\text{g/ml}$ denaturierter Salm Sperm DNA, 0,1% SDS, 6% (w/v) Polyethylene Glycol 6000 (Fluka), 45% Formamid deionisita, $10 \times$ Denhardt's und $1 \times$ SSC hybridisiert. Das Waschen der Filtermembranen wurde mit $1 \times$ SSC während 10 Min bei Raumtemperatur eingeleitet und für 2×30 Min bei 65°C fortgeführt. Die Autoradiographie fand während 1–2 Tagen bei -80°C statt (RX-Film: FUJI New RX oder Amersham MP film mit zwei KYOKKO-Folio PHOS-4 Verstärkerfolien).

Geschlechtsnachweis mit Dot-Blotting

Circa 100–500 ng extrahierte DNA wurden ohne Vorbehandlung direkt auf einen 2 cm breiten Streifen Nylon-Membran (Hybond C, Amersham International) im Abstand von 1,2 cm aufpipettiert. Nach Trocknen der aufgetragenen DNA erfolgte die Denaturierung durch Eintauchen der Streifen für 1–2 Min in eine Lösung aus 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH und die anschließende Neutralisation in 0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH = 7,0. Nach Antrocknen wurden die Streifen während 2,5 Std zur Bindung der DNA an die Membran bei 80°C gebacken (modifiziert nach Tyler et al., 1986 und Gill, 1987).

200 ng Y-190 wurden mittels Nick-Translation nach Standardtechnik mit α - ^{32}P -dCTP (Amersham PB.10205) markiert. Die Prähybridisierung erfolgte während 6 Std und die stringente Hybridisierung über Nacht in der gleichen Lösung bestehend aus 5% Dextransulfat, 45% Formamid deionisita, 0,9 M NaCl, 0,05 M Na-Phosphat pH 7,0, 5 mM EDTA, 1/10 Vol Denhardt's $100 \times$, 0,1% SDS und 0,1 mg/ml denaturierter Salm Sperm-DNA bei 42°C . Die Nylonmembranstreifen wurden anschließend für 30 Min bei 65°C in $2 \times$ SSC + Denhardt's,

für 30 Min bei 65°C in 1× SSC + Denhardt's und für 15 Min bei 65°C in 0,1× SSC + Denhardt's gewaschen. Die Autoradiographie vollzog sich während 1–4 Std bei Raumtemperatur. Als Kontrolle wurden die gleichen Ansätze auf einer zweiten Membran mit der Minisatelliten-Sonde 33.15 hybridisiert.

Lösungen

SSC + Denhardt's = SSC + 1/100 Vol Denhardt's 100× + 0,1% SDS + 0,1% Natriumpyrophosphat

SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M tri-Na-Citrat

Denhardt's 100× = 2% Polyvinylpyrrolidon K90, 2% Bovine Serum Albumin (Pentax Fraction V), 2% Ficoll 400, filtrieren (Schleicher & Schuell)

SDS = Natrium-Dodecyl-Sulfat

Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der serologischen Merkmalsbestimmung an 11 Zürcher Fällen im direkten Vergleich mit denjenigen des DNA-Fingerprintings aufgeführt. Serologisch konnten regelmäßig die Merkmale ABO, Hp, Gm, Km, Tf, PGM1, ADA, AK, ESD, 6-PGD und seltener Pi, Bf und Gc bestimmt werden.

Tabelle 1. Bestrittene Identität bei Blutalkoholproben: Vergleich der Untersuchungsergebnisse nach konventioneller Serologie (HE) und DNA-Fingerprinting (DNA)

Fall	Entscheid		Blutgruppen		DNA-Fingerprint			+ Steigerung – Minderung durch Fingerprint
	HE	DNA	Σ Merk- male	p	Σ Bd B/A	Sex	p	
I	NA	NA	12	1:10 ⁶	14/12	?	6:10 ⁸	+ 15 ×
II	NA	NA	10	7:10 ⁴	19/18	?	1.5:10 ¹¹	+ 10 ⁷ ×
III	NA	NA	10	3:10 ³	15/15	M	1:10 ⁹	+ 10 ⁶ ×
IV	NA	NA	12	8:10 ⁵	17/17	M	1:10 ¹⁰	+ 10 ⁶ ×
V	NA	NA	11	9:10 ⁷	11/11	F	1:10 ⁷	+ 9 ×
VI	NA	NA	11	4:10 ⁷	18/8	M	7:10 ⁶	– 10 ×
VII	NA	NA	9	5:10 ⁴	23/18	M	2:10 ¹¹	+ 10 ⁷ ×
VIII	NA	NA	11	5:10 ⁶	15/12	M	6:10 ⁸	+ 10 ² ×
IX	NA	NA	10	2:10 ³	18/10	M	1:10 ⁶	+ 10 ³ ×
X	NA	NA	12	2:10 ⁵	15/10	M	1:10 ⁶	+ 10 ×
XI	NA	NA	13	2:10 ⁵	14/14	M	4:10 ⁹	+ 10 ⁴ ×

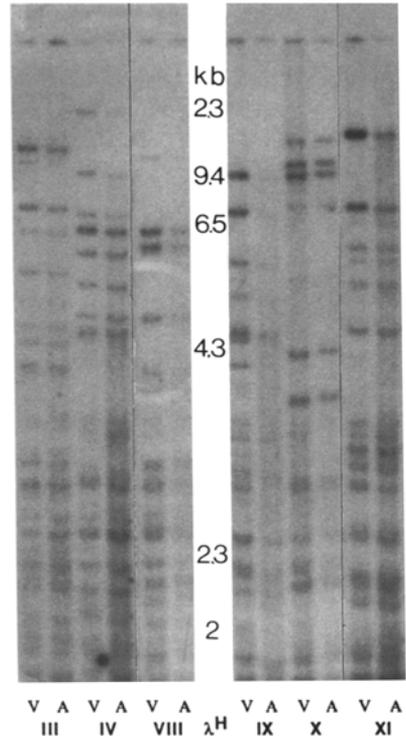
NA: Nichtausschluß im Vergleich Blut: Alkoholblut

Σ Merkmale: Anzahl im Alkoholblut noch typisierbarer serologischer Merkmale

Σ Bd B/A: Anzahl Banden im FP des Vergleichsbluts/Anzahl übereinstimmender Banden im Alkoholblut

p: Wahrscheinlichkeit, daß das Vergleichsblut nicht identisch mit dem Alkoholblut ist. Bei Blutgruppenmarkern mit Merkmalsfrequenzen Europider (Hummel, 1971) berechnet. Annahme einer durchschnittlichen Häufigkeit pro Fingerprint-Bande von 0.25

Abb. 1. DNA-Fingerprinting an Blutalkoholproben wegen bestrittener Identität (Fälle III-IV, VIII-XI, s. Tabelle). V: Vergleichsblut, A: Alkoholblut. In allen Fällen ergab sich eine Bestätigung der Identität. In den Fällen VIII u. IX waren wegen degradierter DNA nur noch schwache FPMuster nachweisbar mit entsprechend relativ tiefen Indizwerten. Teils ergaben sich geringe Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeit der Banden – s. Fall X –, am ehesten erklärbar durch mengenmäßig unterschiedliche DNA-Beladung des Gels. λ^H : DNA-Marker



Die DNA-Fingerprints einiger Fälle sind in Abb. 1 dargestellt. Die Resultate der Geschlechtsbestimmung mit Dot-Blotting sind in Abb. 2 abgebildet. Die Y-190-Sonde ist spezifisch männlich, DNA von Frauen ergibt keine Hybridisierungsmuster.

Diskussion

Mit DNA-Fingerprinting konnten alle Ergebnisse und Schlußfolgerungen der zuvor mit konventioneller Serologie vorgenommenen Vergleichsuntersuchungen zur Identitätsabklärung von Blutalkoholproben bestätigt werden. Bei den 11 untersuchten Fällen lagen nach der serologischen Blutgruppenbestimmung die Wahrscheinlichkeitswerte, daß die Blutformel des Alkoholblutes nur zufällig mit derjenigen des Probanden übereinstimmte, zwischen minimal 2:1000 bis maximal 4:10 Millionen. Es wurde mit für Europäische gültigen Merkmalshäufigkeiten gerechnet (Hummel, 1971).

Exakte Häufigkeiten der Fragmente der Fingerprints liegen nicht vor, doch sind durchschnittliche Häufigkeiten bekannt (Jeffreys et al., 1985b). Segregationsanalysen haben zudem gezeigt, daß keine nennenswerte Koppelung oder geschlechtsspezifische Banden auftreten (Jeffreys et al., 1986). Bei vorsichtiger und konservativer Schätzung der durchschnittlichen Häufigkeit von 0.25 pro Bande im Fingerprint konnten an unserem Material dennoch Indizstärken mit

Werten zwischen minimal 1:1 Million bis $2 \cdot 10^{11}$ berechnet werden (0.25^n ; n = Anzahl vorhandener Banden im FP des Alkoholblutes). In 10 von 11 Fällen ergab sich somit nach DNA-Fingerprinting eine Verbesserung der Aussagekraft, wobei in 6 Fällen diese gegenüber konventioneller Serologie zwischen 1000 bis 10 Millionen Mal besser ausfiel! In 3 der 11 Fälle fielen die Steigerungen mit 9 bis 15 Mal bescheiden aus und in 1 Fall war mit Fingerprinting sogar eine um den Faktor 10 geringere Indizstärke aufgetreten.

Unsere Untersuchungen bestätigten aber auch, daß bereits mit 10–12 polymorphen Blutgruppenmerkmalen doch in mehreren Fällen eine für praktische Belange hohe Sicherheit der Aussage erreicht werden kann. Besonders wertvoll war jedoch die DNA-Untersuchung in Fall III, der nach konventioneller Serologie lediglich eine Indizstärke von 3:1000 aufwies, hingegen nach Fingerprinting mit einem Wert von 1:1 Milliarde nicht mehr den geringsten Zweifel rechtfertigte. Ein weiterer Vorteil der DNA-Fingerprint-Methode ist, daß das Ergebnis nach einer einzigen Untersuchung vorliegt.

Die teils unerwarteten, relativ geringen Indizstärken nach Fingerprinting – die Fälle VI, IX, X mit Werten um 1:1 Million müssen aufgrund der nach FP möglichen Werte in diese Gruppe eingeteilt werden – waren durch eine schlechte Qualität der DNA in den Blutalkoholproben bedingt. Wird Blut ohne Zusatz des Komplexbildners EDTA bei Raumtemperatur stehengelassen, wiederholt aufgetaut oder mit der Post ungekühlt befördert, kann eine unspezifische hydrolytische Spaltung zu einer Fragmentation der hochmolekularen DNA führen. Der Zusatz von EDTA zur Blutprobe bindet die Mg^{2+} -Ionen, die als Kofaktor von den Nukleasen benötigt werden, und verlangsamt damit den Fragmentierungsprozess. Diese unspezifische Fragmentation betrifft vor allem die langen Fragmente und führt zu einem allmählichen Verlust der durch diese langen Fragmente gebildeten Banden im Fingerprint. Extrabanden treten dadurch jedoch nicht auf (Bär et al., 1988). Das Ausmaß der DNA-Degradation kann durch eine kurze Elektrophorese einer kleinen Menge der extrahierten DNA auf einem Testgel nach Ethidium-Bromid-Anfärbung einfach abgeschätzt werden. Eine Störung der gaschromatographischen Alkohol-Analytik durch EDTA-Zusatz zur Blutprobe kann ausgeschlossen werden (Brandenberger, persönliche Mitteilung). Enzymatische Prozesse und somit auch das ADH-Verfahren zur Äthanolbestimmung werden vor allem durch Metallionen gestört. Die Zugabe eines Komplexbildners sollte deshalb keine unerwünschten Nebeneffekte hervorrufen. Als Langzeiteffekt kann EDTA nach Herauslösen der wichtigen Zinkionen durch deren Bindung die Aktivität der ADH allerdings hemmen. Die Dauer einer Routineanalyse ist jedoch kaum so lang, daß dieser späthemmende Effekt zum Tragen kommen dürfte. So konnte gezeigt werden (Cramer, persönliche Mitteilung), daß weder der Zusatz von EDTA zu Vollblut in üblicher (2 mg/ml) noch in 10-facher Konzentration zu einer Verfälschung der ADH-Analytik (Boehringer) führte. Eine Störung des Widmark'schen Nachweisverfahrens ist auch auszuschließen, da eine nennenswerte Verdampfung von EDTA bei 60°C nicht auftritt, weil bei neutralem pH im Blut praktisch keine freie Säure und EDTA als unlösliches Komplexsalz vorliegen.

Der Geschlechtsnachweis mit DNA-Sonden ist besonders einfach und sicher. Er stellt für den Richter zudem ein weiteres wichtiges, vor allem psychologisch

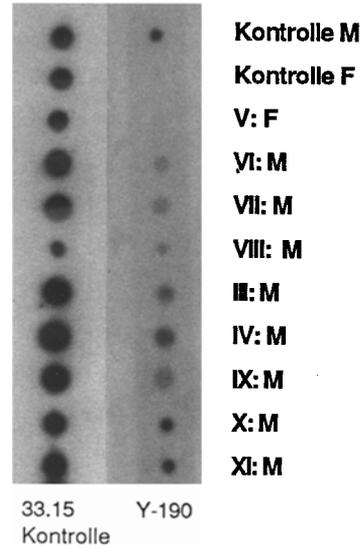


Abb. 2. Geschlechtsbestimmung mit Y-190 an Blutalkoholproben mit Dot-Blotting: Fälle III-XI. Schwärzung des Filmes beweist das Vorhandensein von Y-spezifischen Sequenzen und gestattet die Diagnose „männlich“ (M). Bei fehlender Schwärzung ist die Interpretation „weiblich“ (F) nur zulässig, wenn durch eine Kontrollhybridisierung mit einer nichtgeschlechtsspezifischen Sonde die Anwesenheit von DNA im Untersuchungsmaterial bewiesen werden kann

wertvolles Indiz dar. Bei geschlechtsspezifischen Sonden wie Y-190 muß eine Kontrollhybridisierung mit einer nichtgeschlechtsspezifischen Sonde vorgenommen werden, um bei Ausbleiben einer Schwärzung die Fehldiagnose „weiblich“ zu vermeiden (Abb. 2).

Danksagung. Die DNA-Sonde 33.15 ist Gegenstand eines Patentes. Anfragen betreffend des kommerziellen Einsatzes der Sonde sind direkt zu richten an: ICI Diagnostics, Gadbrook Park, Rudheath, Northwich, Cheshire CW9 7RA, England. Die Sonden sind gegenwärtig noch nicht käuflich erwerbbar. Die Kommerzialisierung eines Untersuchungskits soll bevorzugen. – Für die Überlassung der DNA-Sonde Y-190 danken wir Dr. U. Müller, Children's Hospital, Division of Genetics and Mental Research Center, Boston, USA.

Literatur

- Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W (1988) Postmortem stability of DNA. *Forens Sci Intern* 39:59–70
- Cooke HJ, Schmidtke J, Gosden JR (1982) Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma (Berl)* 87:491–502
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6–13
- Gill P (1987) A new method for sex determination of the donor of forensic samples using a recombinant DNA probe. *Electrophoresis* 8:35–38
- Hummel K (1971) Biostatistische Abstammungsbegutachtung. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, und Ergänzungen
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985a) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314:67–73
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985b) Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316:76–79

- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL, Weatherall DJ, Ponder BAJ (1986) DNA "Fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am J Hum Genet* 39:11-24
- Kleiber M (1987) Häufigkeit und Bedeutung von Identitäts-Untersuchungen an gelagerten Alkoholblutproben. *Blutalkohol* 24:253-261
- Müller U, Donlon TA, Kunkel SM, Lalande M, Latt S (1987) Y-190, a DNA probe for the sensitive detection of Y-derived marker chromosomes and mosaicism. *Hum Genet* 75:109-113
- Oepen I, Trautner R (1968) Zum Ausschluß einer Blutprobenverwechslung durch vergleichende Blutgruppenuntersuchung. *Blutalkohol* 5:270-276
- Tyler MG, Kirby LT, Wood St, Vernon S, Ferris JA (1986) Human blood stain identification and sex determination in dried blood stains using recombinant DNA techniques. *Forens Sci Intern* 31:267-272
- Zink P (1969) Über den Beweiswert von Blutgruppenvergleichsuntersuchungen. *Blutalkohol* 6:477-481

Eingegangen am 21. Juni 1988