

Mikroskopischer Nachweis von Spermien an gewaschenen Textilien nach HY-Liter Färbung

## Mikroskopischer Nachweis von Spermien an gewaschenen Textilien nach HY-Liter Färbung

# Mikroskopischer Nachweis von Spermien an gewaschenen Textilien nach HY-Liter Färbung

Autoren: Galina Kulstein  
Rechtsmedizin Ulm, Deutschland

Dr. Ulrike Schacker, Martin Schatzl  
Galantos Genetics Labor, Mainz, Deutschland

Thorsten Kern, Dr. Michael Gögler  
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland

Datum: April 2018

**Die forensische Untersuchung von DNA-Spuren ist ein wichtiger Schritt im gerichtsmedizinischen Alltag. Oft vergehen zwischen der Straftat und der Untersuchung der Asservate durch forensische Genetiker Wochen oder Monate, in denen tatrelevante Beweismittel gewaschen werden. Diese Studie zeigt, dass selbst nach zweifacher Wäsche bei 60 °C eine ausreichende Anzahl an Spermien detektiert werden kann, die zur Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes herangezogen werden können.**

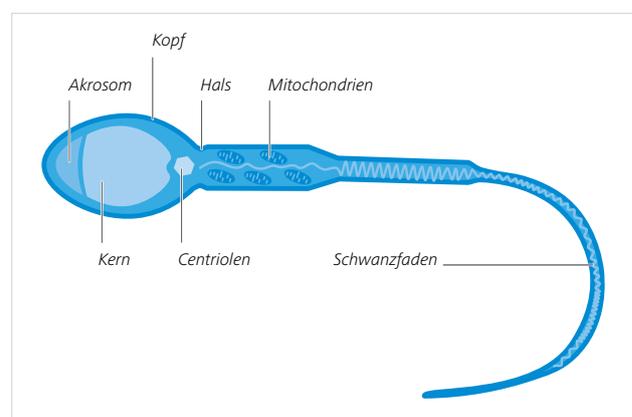
## Einleitung

Der Nachweis von Spermien ist in der Forensik zum Beispiel im Rahmen von Sexualdelikten von großer Bedeutung. Das Sperma eines mutmaßlichen Täters muss auf der Bekleidung des Opfers detektiert und unter Verwendung eines spezifischen Tests identifiziert werden. Anwendung finden beispielsweise RSID-Semen Testchips, die positiv auf Semenovelin (Protein aus der männlichen Samenblase) reagieren. Mit Hilfe von Short Tandem Repeat (STR)-Typisierung, dem so genannten genetischen Fingerabdruck, kann dem Spurenverursacher ein individualspezifisches Profil zugeordnet werden.

Nicht immer werden Vergewaltigungen und sexuelle Überfälle zeitnah zur Anzeige gebracht. Oft vergehen zwischen Ausführung des Strafdelictes und der Untersuchung der Asservate durch forensische Genetiker Wochen oder Monate. In diesem Zeitraum kommt es vielfach vor, dass tatrelevante Asservate wie Bettlaken oder Bekleidung der Opfer einmal oder mehrfach gewaschen werden. In mehreren Studien konnte durch systematische Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, DNA aus gewaschenen Asservaten zu extrahieren und ein STR-Profil anzufertigen [1,2]. Unklar war jedoch, ob es nach ein- und zweifachem maschinellen Waschen auch möglich ist, einen mikroskopischen Spermien-Nachweis mittels antikörperbasierter Fluoreszenzdetektion (Sperm-HY-Liter) und einen Semenovelin-Nachweis (RSID-Semen Test) durchzuführen.

## Bau und Funktion menschlicher Spermien

Spermatozoen sind begeißelte Zellen, die im Ejakulat von männlichen Individuen vorkommen und der Befruchtung weiblicher Keimzellen dienen. Morphologisch lassen sich drei charakteristische Abschnitte unterteilen (Abb. 1). An der Vorderseite befindet sich der Spermienkopf mit dem Nukleus, welcher der Träger des haploiden Chromosomensatzes ist. Der Vorderseite aufgelegt befindet sich das Akrosom, eine mit Enzymen gefüllte Kopfkappe, die das Eindringen des Spermiums in die Eizelle erleichtern soll. Das Mittelstück, der Hals, beinhaltet eine Vielzahl an Mitochondrien, die Energie für die Fortbewegung der Spermien liefern. Das Endstück bildet die Geißel. Dieses längsverlaufende Fibrillensystem aus Mikrotubuli dient der Fortbewegung.



**Abbildung 1** Aufbau eines Spermatozoon

### Versuchsdesign

Vor dem maschinellen Waschen wurden Stoffstücke bestehend aus 100 % Baumwolle mit 100  $\mu$ l, 20  $\mu$ l und einer Verdünnung von 1:10  $\mu$ l nativem Sperma versehen und über Nacht bei Raumtemperatur zum Trocknen belassen. Anschließend wurden die mit Sperma versehenen Kleidungsstücke in einer Waschmaschine (Miele Softronic W 3741) unter Zugabe von Pulverwaschmittel (Ariel Color) gereinigt. Das Waschprogramm umfasste 140 min, geschleudert wurde bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (U/min). Der Spermienachweis erfolgte nach einmaligem und nach zweimaligem Waschen unter gleichbleibenden Bedingungen. Für die Positivkontrolle (Abb. 4) wurde ein mit 20  $\mu$ l Sperma versehenes Stück Baumwollstoff extrahiert.

### RSID-Semen-Test und Sperm-HY-Liter-Detektion

Aus den gewaschenen Stoffstücken wurden die mit wasserfester Stofffarbe markierten Spermaflecken herausgeschnitten und in jeweils 700  $\mu$ l RSID-Universalpuffer extrahiert. Für den RSID-Test (Antikörper basierter Dünnschichtchromatographie-Test) wurden 100  $\mu$ l des Extrakts auf die Test-Kassette pipettiert und das Ergebnis nach 10 min abgelesen (Abb. 2).

Das Stoffstück wurde in einem DNA IQ™ Spin Basket (Promega Corporation) für 3 min bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Dieses Extrakt wurde dem ersten Extrakt zugefügt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 60  $\mu$ l verworfen. Davon wurden 2 – 10  $\mu$ l auf einen Objektträger aufgetragen und für die HY-Liter-Färbung genutzt. Diese erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

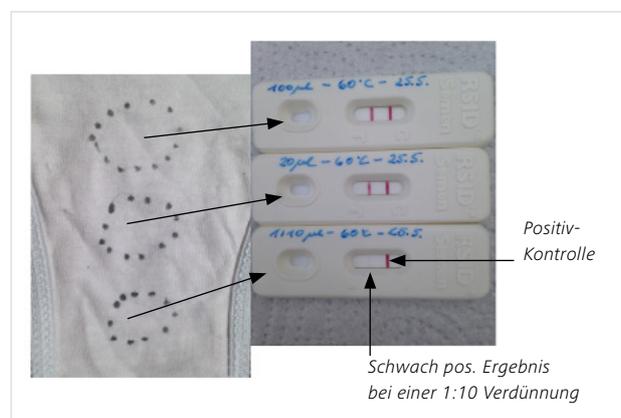
Die HY-Liter-Färbung basiert auf einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, der an den Spermienkopf bindet. Parallel erfolgt eine Anfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Unter Verwendung des Alexa 488 Filters zeigen die Spermien unter dem Mikroskop eine grüne Fluoreszenz (Abb. 3, 4). Die Zellkerne aller Zellen, d.h. Epithelzellen und Spermienzellen, leuchten unter Verwendung des DAPI-Filters blau. Die Spermienzellen lassen sich durch diese Färbemethode eindeutig gegenüber allen anderen Zellen identifizieren. Der Rest der Spermienlösung wurde für die DNA-Extraktion eingesetzt. Die Isolierung der Spermien-DNA für die STR-Analyse erfolgte mit dem QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN).

### Empfohlene Mikroskopausstattung

Es wurde ein Lichtmikroskop Axio Scope.A1 (Abb. 5) mit einer HXP 120 Lichtquelle und der Mikroskopkamera Axiocam ERc 5s verwendet. Die Dokumentation der Bilder erfolgte mit der ZEN Imaging Software und einem iPad. Dieses war über WLAN mit der Mikroskopkamera verbunden. Bildaufnahmen und Bearbeitung waren unkompliziert und ohne Vorkenntnisse der Software möglich.

### Durchführung

Die Präparation und Bearbeitung der Proben erfolgte parallel im Labor der Rechtsmedizin Ulm und im Labor der Galantos Genetics in Mainz.

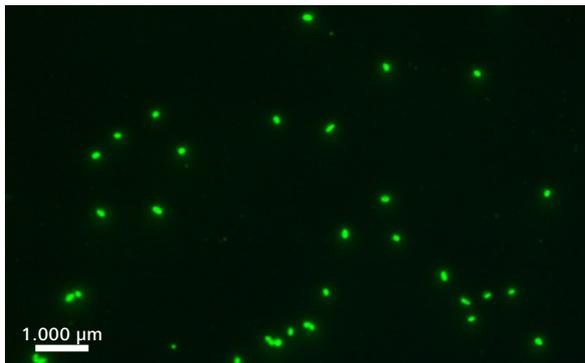


**Abbildung 2** RSID-Nachweis der Proben: Auf das Stoffstück wurden 100  $\mu$ l, 20  $\mu$ l oder eine 1:10 Verdünnung aufgetragen. Alle Proben wurden einmal bei 40 °C oder einmal bzw. zweimal bei 60 °C gewaschen.

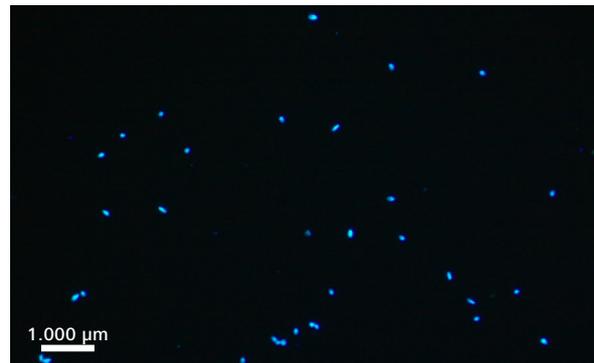
Die Ergebnisse zeigen, dass die immunologische Spermadetektion mittels RSID-Test sowohl bei schwächeren (20  $\mu$ l Volumenspuren) als auch bei intensiveren Antragnungen (100  $\mu$ l Volumenspuren), die entweder bei 40 °C oder bei 60 °C unter Zugabe von Waschmittel gewaschen wurden, gelingt. Darüber hinaus konnte auch nach zweimaliger Reinigung bei 60 °C und sogar bei 1:10 verdünnten Antragnungen noch ein Nachweis von Semenogelin erbracht werden. Auch durch die antikörperbasierte Fluoreszenzdetektion mittels Sperm-HY-Liter wurden unabhängig vom angetragenen Spurenvolumen und der Waschttemperatur Spermien detektiert. Die Anzahl an nachweisbaren Spermienzellen zeigte erwartungsgemäß eine Abnahme mit zunehmender Waschttemperatur bzw. abnehmendem Antragnungsvolumen und bei mehrfachem Waschen. Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass aus 20 Spermien ungefähr 60 pg DNA extrahiert werden können und dass diese

Proben-Nr.	Probe	Waschtemperatur	$\mu\text{l}$ aufgetragen	RSID	HY-Liter	DNA-Täter-Profil-Erstellung
1	Baumwolle	40 °C	100	positiv	ca. 1000 Spermien	positiv
2	Baumwolle	40 °C	20	positiv	ca. 800 Spermien	positiv
3	Baumwolle	60 °C	100	positiv	ca. 380 Spermien	positiv
4	Baumwolle	60 °C	20	positiv	70 Spermien	teilweise positiv
5	Baumwolle	60 °C	1:10	schwach positiv	keine in 10 $\mu\text{l}$ Extrakt	teilweise positiv
6	Baumwolle	2 $\times$ 60 °C	20	schwach positiv	47 Spermien	teilweise positiv

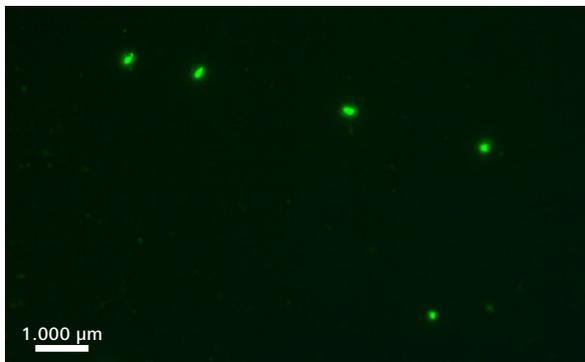
**Probe 1 (13-101) – Alexa – 200  $\times$  vergrößert**



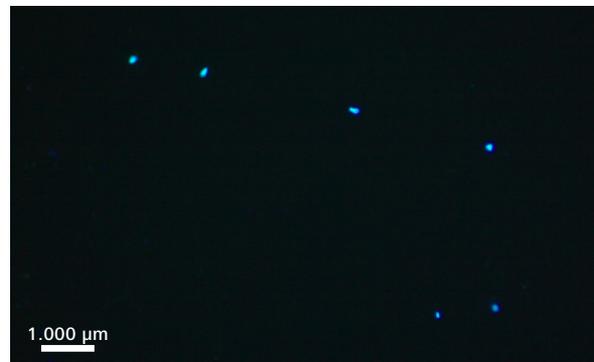
**Probe 1 (13-101) – DAPI – 200  $\times$  vergrößert**



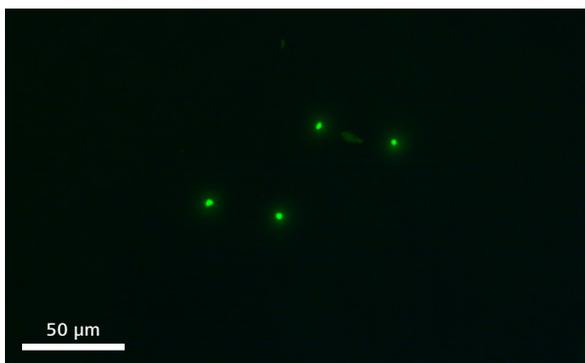
**Probe 2 (19-72) – Alexa – 200  $\times$  vergrößert**



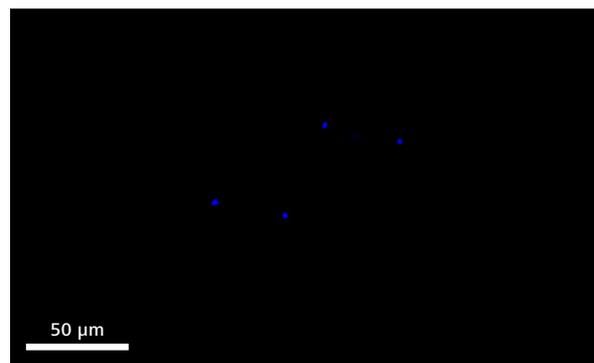
**Probe 2 (19-72) – DAPI – 200  $\times$  vergrößert**



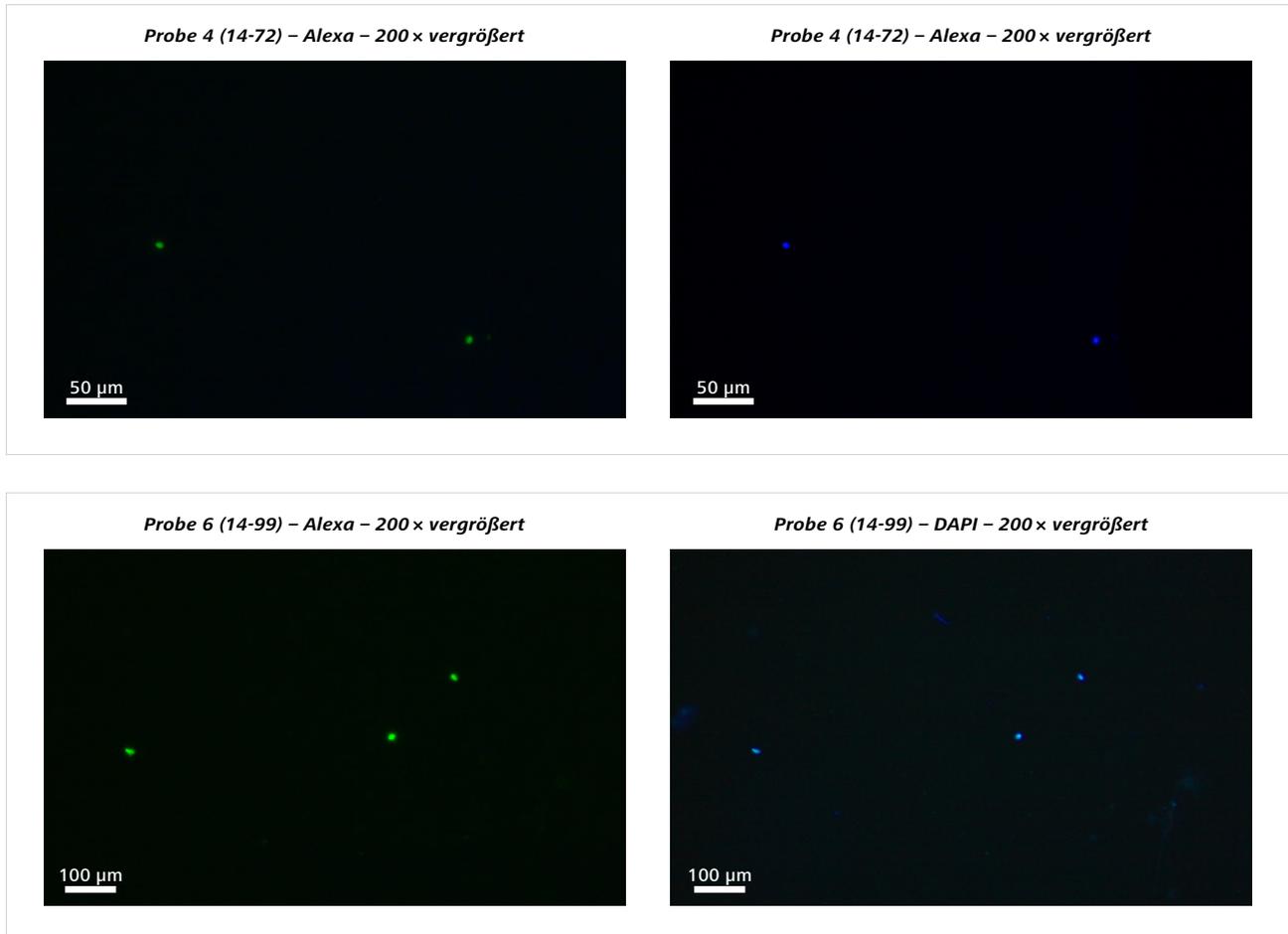
**Probe 3 (11-100) – Alexa**



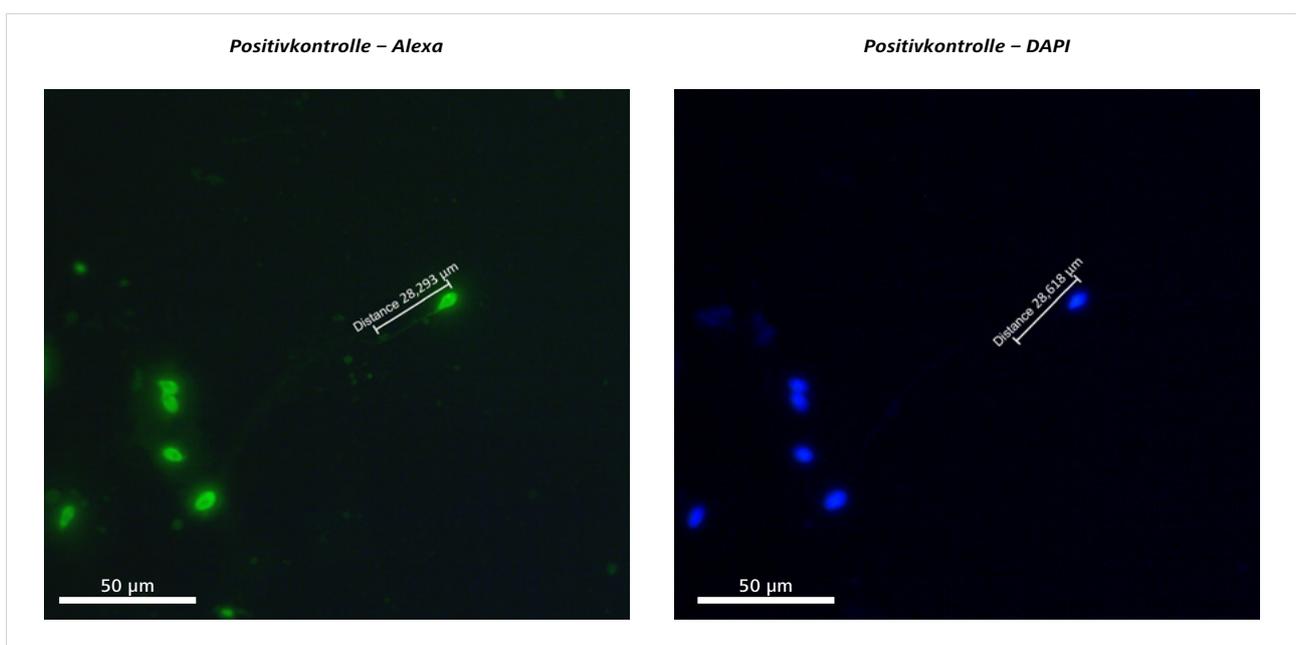
**Probe 3 (11-100) – DAPI**



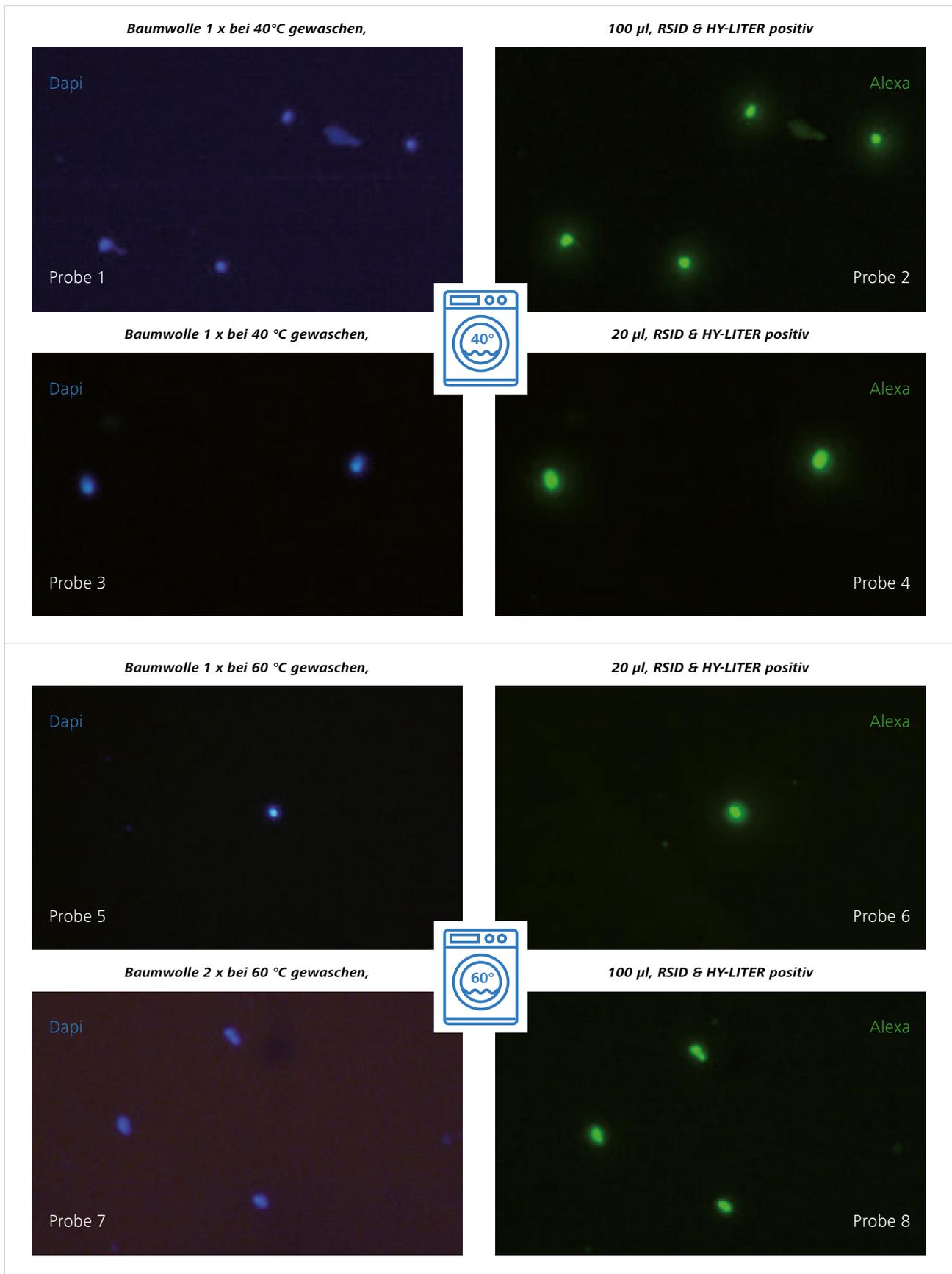
**Abbildung 3** Einzelproben: Antikörper basierte Spermienfärbung mit HY-Liter (grüne Fluoreszenz) und parallele Anfärbung der Zellkerne mit DAPI



**Abbildung 3** Fortsetzung



**Abbildung 4** Positivkontrolle HY-Liter : Antikörper basierte Spermienfärbung (grüne Fluoreszenz – Alexa 488) und parallele Anfärbung der Zellkerne (blaue Fluoreszenz – DAPI)



**Abbildung 5** Spermennachweis an gewaschenen Textilien mittels HY-LITER-Färbung



**Abbildung 6** Fluoreszenzmikroskop ZEISS Axio Scope.A1

Menge ausreicht, um eine STR-Typisierung durchzuführen [3]. Die anschließende DNA-Untersuchung in allen analysierten Proben zeigte somit entweder positive oder teilweise positive Resultate und ermöglichte eine erfolgreiche Individualisierung des Spurenverursachers.

#### **Schlussfolgerung für die forensische Fallarbeit**

Diese Studie zeigt, dass es sinnvoll ist, gewaschene Kleidungsstücke zur Aufklärung eines Sexualdeliktes zu untersuchen, da selbst nach zweifacher Wäsche bei 60 °C eine ausreichende Anzahl an Spermien detektiert werden kann. Dies bedeutet, dass die DNA noch intakt ist und somit zur Erstellung eines STR-Profiles, eines genetischen Fingerabdruckes des Täters verwendet werden kann.

#### **References:**

- [1] Andrews C, Coquoz R (1994) PCR DNA typing of washed stains, In: Walter Bär, Angelo Fiori, Umberto Rossi (ed.) Advances in Forensic Haemogenetics 5, Springer Verlag, Heidelberg, pp 343 – 345.
- [2] Brayley-Morris H, Sorrell A, Revoir AP, Meakin GE, Courts DS, Morgan RM (2015) Persistence of DNA from laundered semen stains: implications for child sex trafficking cases. Forensic Sci Int Genet. 19:165 – 171.
- [3] Schneider C, Müller U, Kilper R, Sibertz B (2012) Low copy number DNA profiling from isolated sperm using the aureka®-micromanipulation system. Forensic Sci Int Genet. 6:461 – 465.



**Carl Zeiss Microscopy GmbH**  
07745 Jena, Germany  
microscopy@zeiss.com  
www.zeiss.com/axioscope



Nicht alle Produkte sind in jedem Land erhältlich. Die Verwendung von Produkten für medizinische Diagnosen, Therapien oder Behandlungen unterliegt möglicherweise lokalen Beschränkungen. Nähere Informationen erhalten Sie bei Ihrem ZEISS Vertriebsmitarbeiter.

DE\_41\_013\_146 | CZ 06-2019 | Design, scope of delivery and technical progress subject to change without notice. | © Carl Zeiss Microscopy GmbH