



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA
Laboratori Didattici del Corso di Laurea in Biotecnologie

CRIME SCENE DO NOT CROSS

VALIGIA DEL RICERCATORE: STR BASE

ANALISI DELLE "IMPRONTE GENETICHE"

L'idea di distinguere gli individui a seconda delle loro caratteristiche genetiche non è nuova. Scoperta nel 1900 da Karl Landsteiner, la suddivisione del sangue nei gruppi sanguigni del sistema ABO fu il primo marcatore genetico ad essere usato nelle scienze forensi e fu successivamente integrato dal sistema MN (1927) e dal fattore Rh (1937).

Tuttavia, anche analizzando simultaneamente i tre sistemi che determinano i gruppi sanguigni, si otterrebbero risultati identici in un soggetto ogni dieci; è proprio questa uguaglianza a rendere le trasfusioni sanguigne possibili. Per le scienze forensi, però, ciò è uno svantaggio: i risultati possono dimostrare che il campione di sangue prelevato non viene dal sospettato X, ma non possono provare con sicurezza che esso provenga *davvero* dalla Persona Sospetta Y.

Negli anni Settanta e Ottanta vi furono progressi nell'analisi di differenti forme di enzimi (isoenzimi) nei globuli rossi e nel siero sanguigno. La certezza che il campione provenisse dal sospettato dipendeva dal numero di proteine analizzate (solitamente quattro); questa sicurezza è denominata *potere di discriminazione*. Il potere di discriminazione fornito dalla combinazione di queste tecniche era ancora pari a 1:1000, sicuramente meglio dell'1:10 ottenuto dall'analisi dei gruppi sanguigni, ma ancora non sufficiente. Per avere un maggior potere di discriminazione, si ebbe bisogno di guardare più da vicino la nostra composizione genetica.

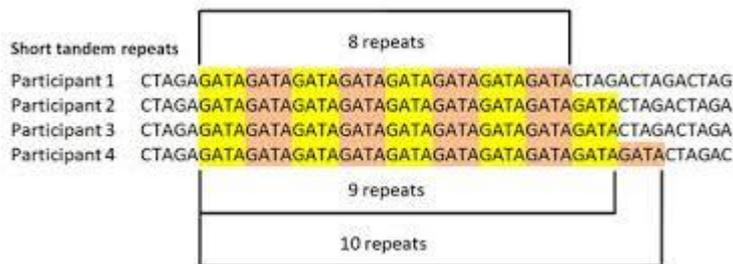
La scoperta di un numero elevatissimo di polimorfismi del DNA e successivamente l'applicazione delle metodiche PCR (Polymerase Chain Reaction) al loro studio, determinarono una vera e propria rivoluzione soprattutto nel campo delle indagini criminalistiche: infatti, essendo il DNA presente in tutte le cellule nucleate e molto più resistente a fenomeni di degradazione fisica rispetto ai

marcatori proteici tradizionali, fu possibile estendere la ricerca ad ogni sorta di reperto biologico: sangue, sperma, formazioni pilifere, tessuti, saliva, urina, polpa dentaria, resti ossei.

Con l'introduzione della PCR sono stati individuati anche nuovi tipi di polimorfismi che non potevano essere rivelati con altri tipi di analisi, i cosiddetti STR (*Short Tandem Repeat*) che rappresentano ad oggi la metodica più semplice, rapida e diffusa per le indagini di genetica forense. Nel 1989 è stata riportata l'esistenza nel genoma umano di loci ipervariabili appartenenti al DNA non codificante; le mutazioni che avvengono in questa regione, essendo meno soggette alle forze di pressione di selezione, vengono trasmesse alla discendenza con un aumento della variabilità genetica.

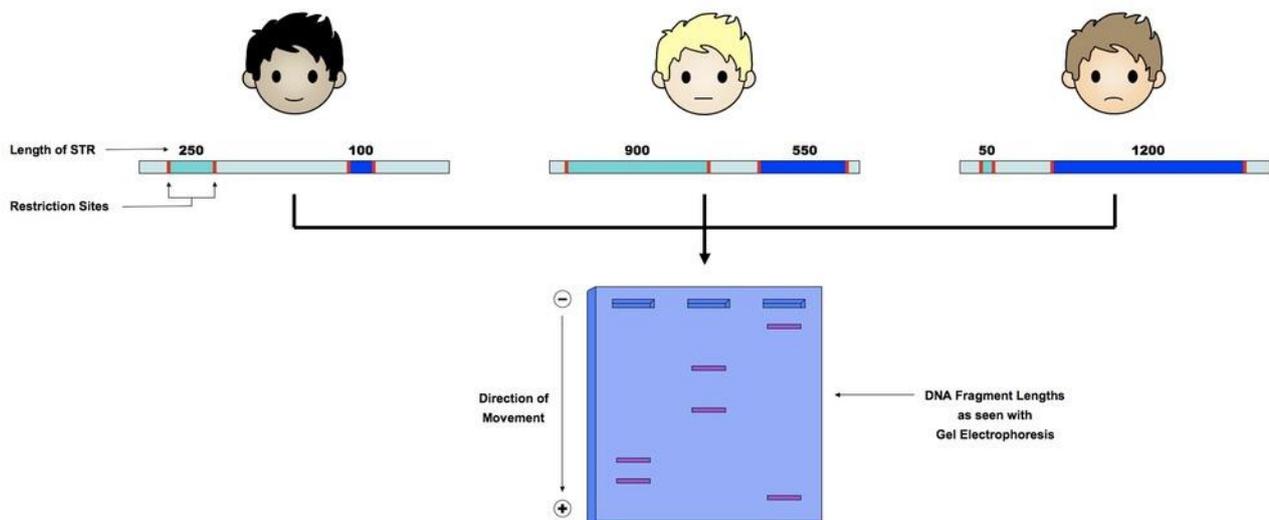
I polimorfismi STR sono polimorfismi di lunghezza, legati al numero variabile di unità ripetitive presenti nei diversi alleli. In relazione alle piccole dimensioni della sequenza di base, tali loci sono stati definiti microsatelliti o *Short Tandem Repeat* possedendo unità di ripetizione comprese tra le due e le sette paia di basi, con lunghezza massima di circa 350 paia di basi. I microsatelliti sono distribuiti uniformemente su tutto il genoma e ricorrono ogni 10.000 nucleotidi e attualmente si conoscono migliaia di loci STR.

Affinchè un locus STR possa essere utilizzato per l'analisi di PCR è necessario che la regione STR sia fiancheggiata da sequenze conservate nelle quali verranno disegnati i primers. Un locus STR comunemente utilizzato si chiama, ad esempio TH01 ed è costituito da unità di quattro nucleotidi che si ripetono (TCAT). Nella popolazione sono presenti più di 20 differenti alleli di tale locus a seconda del numero di ripetizioni. Al termine della reazione di amplificazione si produrranno quindi frammenti di dimensioni differenti a seconda del numero di ripetizioni.



L'essere umano ha due copie di ciascun cromosoma ed ha quindi anche due copie di una determinata regione STR. Se, per ogni copia di STR, qualcuno avesse lo stesso numero di ripetizioni, l'analisi PCR rivelerebbe una sola dimensione di frammenti di DNA: la persona in questione sarebbe omozigote per l'allele STR. Se i due cromosomi portassero alleli non identici per quella ripetizione STR, si vedrebbero due dimensioni di frammenti e si potrebbe affermare che la persona è eterozigote.

Una volta che il DNA è stato amplificato, può essere separato sia con elettroforesi su gel sia, nelle moderne scienze forensi, tramite sequenziamento elettroforetico automatico, e visualizzato come impronta genetica.



Se si analizza solamente una ripetizione STR, la possibilità che due individui non imparentati abbiano la stessa impronta genetica basata sulla PCR è alta, tra 1:2 e 1:100. Per superare questo svantaggio, si analizzano simultaneamente ripetizioni STR multiple. Con 16 STR, di prassi utilizzate dalle scienze forensi si può ottenere un potere di discriminazione di 1:10 miliardi (equivalente cioè ad un solo individuo in tutta la popolazione mondiale).

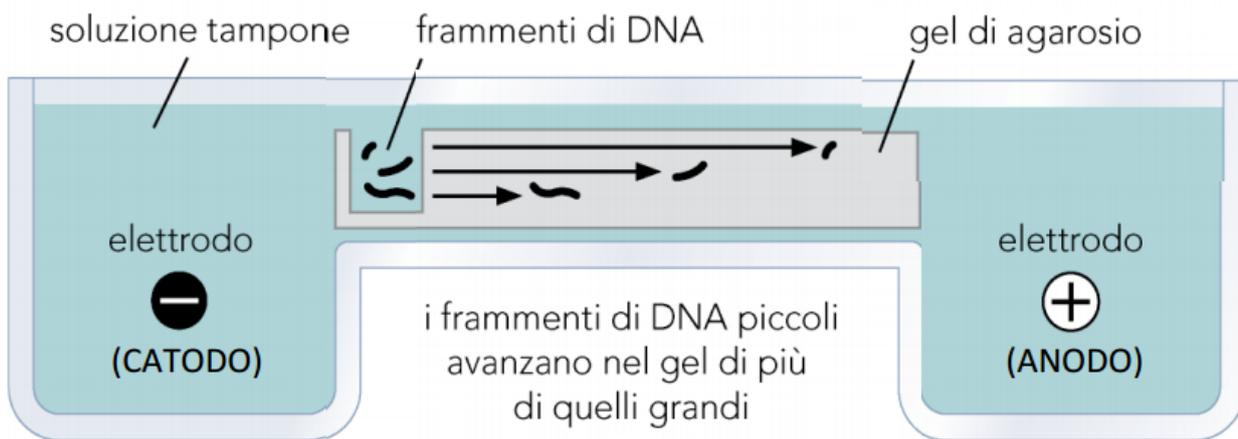
La tipizzazione di loci STR nei test di identificazione umana è stata facilitata dalla possibilità di amplificare più loci simultaneamente in un'unica reazione di PCR, utilizzando una coppia di primers specifici per ogni locus. I frammenti amplificati hanno un peso molecolare diverso per il variabile numero di ripetizioni contenute nella regione polimorfa e sono facilmente tipizzabili tramite elettroforesi capillare mediante marcatura fluorescente. Nell'elettroforesi capillare, un sequenziatore automatico costituito da un capillare contenente il polimero, inietta i campioni (che incorporano uno standard interno) nell'ordine specificato dall'operatore, esegue la separazione elettroforetica (che è più veloce grazie all'alto voltaggio che si può applicare) e analizza i dati. L'elettroforesi capillare applicata a metodi di rivelazione basati sulla fluorescenza laser indotta, utilizzando la tecnologia della multicolor detection (a 5 fluorocromi) permette di analizzare loci multipli compresi quelli che hanno alleli che si sovrappongono in lunghezza, in una singola iniezione capillare. Dopo la corsa i dati vengono elaborati da un computer e il risultato grafico dell'elettroforesi, detto elettroferogramma, viene restituito come picchi di colore corrispondente a quello del fluorocromo usato per marcare il frammento di interesse.

Elettroforesi degli acidi nucleici su gel di agarosio

Si tratta di una tecnica analitica e separativa che si basa sul movimento di molecole elettricamente cariche, immerse in un fluido, per effetto della generazione di un campo elettrico mediante una coppia di elettrodi. La separazione per dimensione degli acidi nucleici viene condotta su gel d'agarosio. Infatti, quando sottoposti ad un campo elettrico, il DNA carico negativamente migra attraverso il gel in un tampone adeguato verso il polo positivo. La velocità di corsa dipende dalla densità del gel, dalle dimensioni del frammento, dalla corrente applicata e dalla forza ionica del tampone. L'elettroforesi dei prodotti di PCR viene condotta in una cella apposita, in cui il gel d'agarosio viene immerso nel tampone di corsa e ad esso si applica un campo elettrico di 10-20 V

per ogni cm di lunghezza, che permette una migrazione sufficientemente veloce, ma senza distorsione delle bande.

camera di elettroforesi



PROTOCOLLO OPERATIVO

In questo laboratorio verranno forniti campioni di DNA amplificati mediante PCR relativi a campioni biologici ritrovati sulla scena del crimine (SC1 e SC2) e a campioni biologici relativi alla Vittima, Sospettato A, Sospettato B, Sospettato C. Mediante la tecnica di Elettroforesi degli acidi Nucleici su gel di agarosio verrà confrontato il profilo di migrazione dei diversi DNA.

Lavoro preliminare:

- Allestire le postazioni lavoro
- Guardare video sull'utilizzo delle micropipette
- Guardare video Tutorial del protocollo operativo
- Prove di pipettata con acqua ai ragazzi prima di iniziare l'esperimento

PROTOCOLLO

- Preparazione del gel di agarosio: e' sufficiente un solo gel per caricare tutti i campioni di PCR. E' però consigliabile preparare due gel per dare la possibilità a tutti gli studenti di caricare almeno un campione di DNA sul gel.
- La percentuale ottimale del gel è del 1.8% m/V in tampone TAE 1X. Il volume necessario è di 50 ml.
- Preparare in un cilindro 500 ml di tampone TAE 1X a partire da uno stock concentrato 50X, miscelare la soluzione diluita. A tal fine dobbiamo miscelare 10 ml della soluzione concentrata e portare a 500 ml con acqua deionizzata. Chiudere il cilindro con il parafilm e agitare per inversione.
- Preparare la vaschetta elettroforetica con i pettini.
- Pesare quindi 0,9 g di agarosio, porli nella beuta di vetro (**attenzione la beuta è in vetro, maneggiare con cura per non ferirsi**), aggiungere 50 ml di tampone e portare ad ebollizione nel microonde (non prolungare la fase di ebollizione, sono sufficienti circa 10-20 secondi di ebollizione). **N.B. non inserire stagnola nel forno a microonde**
- Aggiungere 2.5 µl di Gel Red, miscelare delicatamente e colare tutto nella vaschetta precedentemente preparata.
- Attendere la polimerizzazione del gel.
- Togliere delicatamente il pettine.
- Nel caso in cui il gel non venga utilizzato subito per la corsa elettroforetica, avvolgerlo nel domopack o in un sacchetto di plastica e conservarlo in frigorifero a 4°C, altrimenti procedere come indicato sotto:
- Inserire la vaschetta nella cameretta elettroforetica.
- Aggiungere 350 ml di tampone TAE 1X.
- Scongellare i campioni di DNA (oppure la miscela per prove di caricamento) e procedere con il caricamento dei campioni secondo le modalità spiegate nel video. I campioni di DNA sono già pronti per il caricamento in quanto addizionati di Loading dye. Utilizzare la centrifuga per un breve spin per raccogliere tutto il volume sul fondo della provetta eppendorf.
- Se necessario consultare anche i video sull'utilizzo delle micropipette.
- Caricare 10 µl di DNA in ogni pozzetto (seguendo le indicazioni del video tutorial), mantenendo il seguente ordine di caricamento:
- Marker 1 kb – Vittima (V)-Scena del crimine 1 (SC1)-Scena del Crimine 2 (SC2)-DNA sospettato A (DNA A)-DNA sospettato B (DNA B)-DNA sospettato C (DNA C)

- N.B. Nel box con i reagent è presente una Eppendorf siglata “DNA per prove di pipettata”. Caricare 5 o 10 µl per ogni pozzetto avanzato. Contiene del DNA non inerente all’esperimento ma comunque visibile sul gel al termine della corsa
- Avviare la corsa elettroforetica a 100 V costanti per circa 45 minuti.
- Al termine della corsa togliere corrente all’apparato, aprire la cameretta, estrarre il gel con la sua vaschetta, posizionare il gel (togliendolo dalla vaschetta) sulla superficie del transilluminatore.
- **Coprire il gel con il vetro di protezione (attenzione non esporsi mai direttamente ai raggi UV perché dannosi per gli occhi.** Accendere le lampade UV del transilluminatore e visionare il risultato della corsa elettroforetica. Documentare il risultato con una foto utilizzando uno smartphone.

Note

- I rifiuti (puntali, provette, guanti, gel dopo l’utilizzo ecc) verranno raccolti in un bidoncino in cui viene inserito un sacchetto di plastica e al termine dell’attività il sacchetto verrà chiuso e reinserito nella valigia. Tali rifiuti verranno opportunamente smaltiti presso il nostro Dipartimento.
- Tutto il materiale utilizzato va riposto accuratamente nella valigia. Se la valigia viene utilizzata da più classi ci sarà a disposizione un box di polistirolo contenente i DNA per ogni classe.
- **CHIEDIAMO GRANDE CURA NELLA CONSERVAZIONE E RESTITUZIONE DI TUTTO IL MATERIALE (STRUMENTAZIONE, CAVETTI, MICROPIPETTE, BOX DI POLISTIROLO ECC).**

Possibile schema di caricamento dei campioni

Posizione	Campione	Volume	note
1	Marcatore peso molecolare	10 µl	Campione ufficiale
2	DNA VITTIMA	10 µl	Campione ufficiale
3	DNA SCENA CRIMINE 1	10 µl	Campione ufficiale
4	DNA SCENA CRIMINE 2	10 µl	Campione ufficiale
5	DNA A	10 µl	Campione ufficiale
6	DNA B	10 µl	Campione ufficiale
7	DNA C	10 µl	Prova caricamento
8		5 µl	Prova caricamento
9		5 µl	Prova caricamento
10		5 µl	Prova caricamento
11		5 µl	Prova caricamento
12		5 µl	Prova caricamento
13		5 µl	Prova caricamento
14		5 µl	Prova caricamento

CONCLUSIONI CHE DOVRA' ELABORARE CIASCUN GRUPPO AL TERMINE DELL'ESPERIMENTO

- C'E' UN DNA FRA I SOSPETTATI COMPATIBILE CON IL DNA RITROVATO SULLA SCENA DEL CRIMINE? SE SI QUALE?
- E' SUFFICIENTE QUESTA ANALISI PER INDICARE IN MANIERA CERTA CHE I DUE DNA APPARTENGONO ALLO STESSO SOGGETTO?
- L'ANALISI ESEGUITA CI CONSENTE DI ESCLUDERE CON SICUREZZA ALCUNI SOSPETTATI?
- QUANTE VARIANTI ALLELICHE DEL LOCUS STR ANALIZZATO (LOCUS TH01) SONO PRESENTI NEL DNA DEI SOGGETTI ANALIZZATI?

Marker di Peso Molecolare

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

