



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA

Laboratori Didattici DMMT

CRIME SCENE DO NOT CROSS

VALIGIA DEL RICERCATORE AVANZATA

Ogni gruppo di lavoro sarà costituito da 4-5 studenti ai quali verrà consegnato tutto il materiale per eseguire l'analisi dei campioni di DNA dei "sospettati" e metterli a confronto con il DNA ritrovato nella scena del crimine. Per motivi di tempo il DNA dei diversi soggetti è stato estratto in precedenza e l'analisi da eseguire prevede prima l'amplificazione mediante PCR di una regione STR chiamata locus TH01 e la successiva analisi mediante elettroforesi dei frammenti prodotti. Ogni gruppo di lavoro dovrà quindi trarre le opportune conclusioni in base al tracciato elettroforetico ottenuto.

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

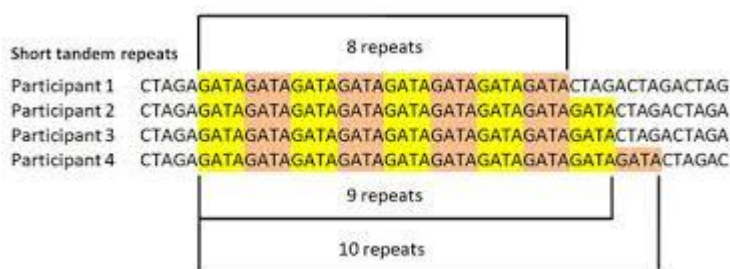
gruppi sanguigni, ma ancora non sufficiente. Per avere un maggior potere di discriminazione, si ebbe bisogno di guardare più da vicino la nostra composizione genetica.

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.

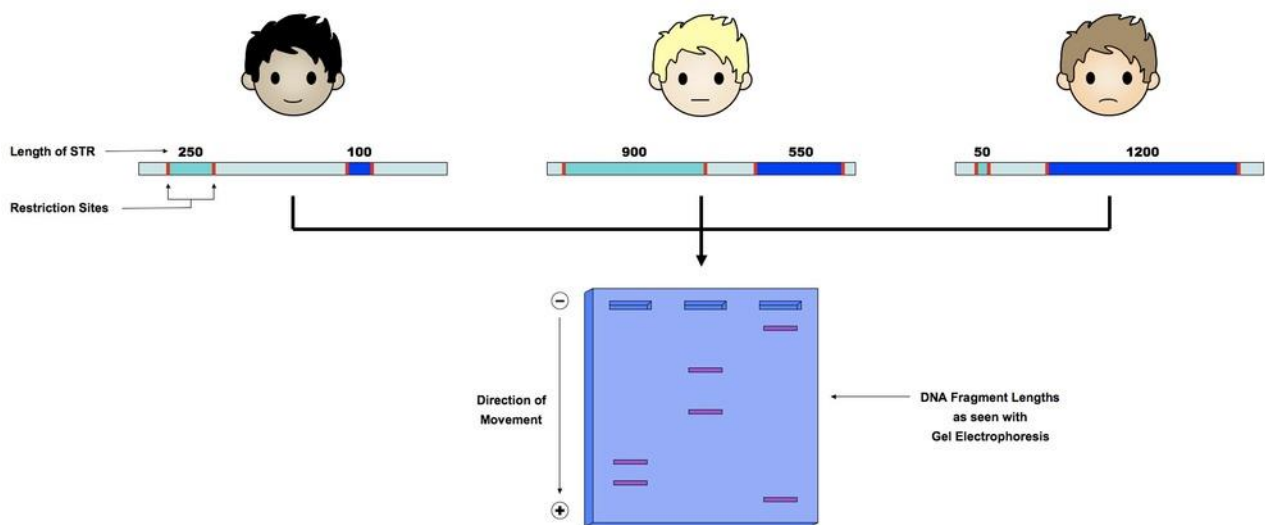
I polimorfismi STR sono polimorfismi di lunghezza, legati al numero variabile di unità ripetitive presenti nei diversi alleli. In relazione alle piccole dimensioni della sequenza di base, tali loci sono stati definiti microsatelliti o *Short Tandem Repeat* possedendo unità di ripetizione comprese tra 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.



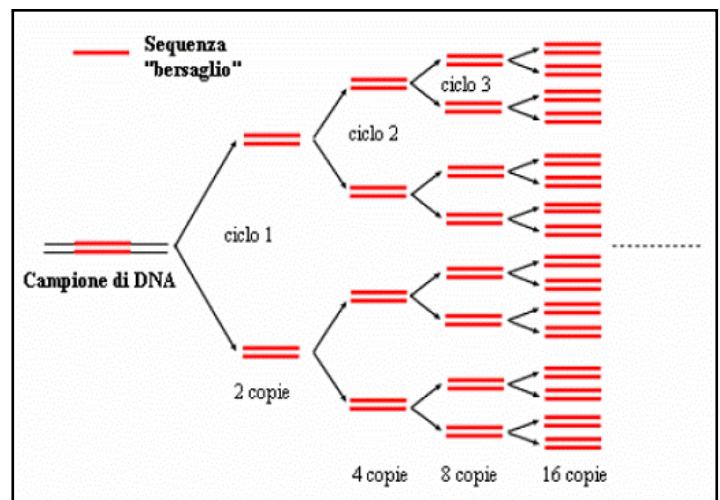
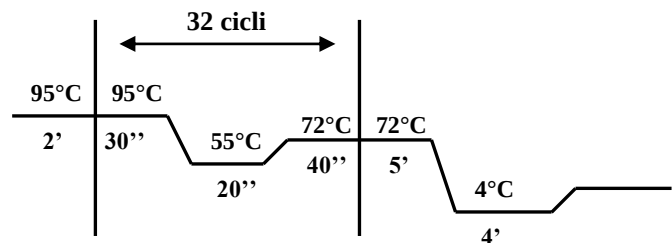
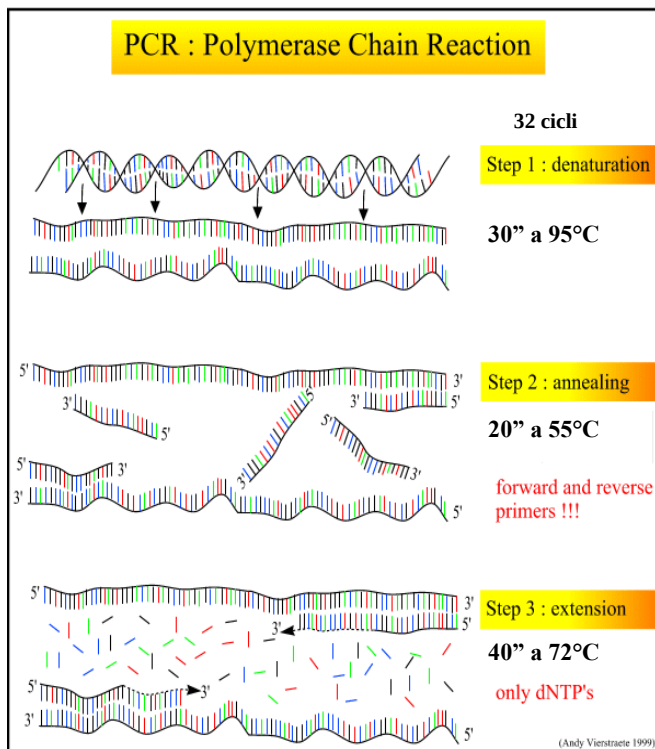
Se si analizza solamente una ripetizione STR, la possibilità che due individui non imparentati abbiano la stessa impronta genetica basata sulla PCR è alta, tra 1:2 e 1:100. Per superare questo svantaggio, si analizzano simultaneamente ripetizioni STR multiple. Con 16 STR, di prassi utilizzate dalle scienze 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.

REAZIONE DI PCR (Polimerase Chain Reaction)

È una tecnica che permette di amplificare *in vitro*, in maniera esponenziale, sequenze di DNA di interesse. La reazione, che si ripete ciclicamente per un numero variabile di volte, è catalizzata dall'enzima *Taq* polimerasi, una particolare DNA polimerasi estratta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* che lavora in maniera stabile ad una temperatura di 72°C. Le DNA polimerasi hanno bisogno di un innesco per poter iniziare la reazione e ciò viene fornito attraverso i **primer**, delle corte sequenze nucleotidiche con sequenza complementare alla sequenza che si vuole amplificare. Alla reazione vengono inoltre aggiunti un tampone, che ricrea le condizioni ottimali per la reazione, e i deossi-nucleotidi (**dNTP**), che saranno i "mattoni" con cui verranno costruiti i nuovi filamenti. La reazione viene condotta utilizzando uno strumento chiamato termociclatore, capace di ripetere ciclicamente la reazione secondo le condizioni sperimentali da utilizzare.

1. Il frammento di DNA da amplificare viene **denaturato** ad una temperatura di circa **95°C** in modo da separare i due filamenti
2. La temperatura viene poi abbassata per permettere l'appaiamento (**annealing**) dei due primer con le sequenze complementari poste agli estremi della sequenza da amplificare. La temperatura ottimale varia in relazione alla sequenza nucleotidica del primer
3. Si alza poi la temperatura a **72°C** per favorire la reazione di sintesi del DNA attraverso un processo di polimerizzazione chiamato anche estensione (**extension**)



SCHEMA DI UN CICLO DI PCR

Un tipico programma di amplificazione è composto da tre passaggi:

1. Una denaturazione termica prima dei cicli di amplificazione: (95°C);
2. Diverse ripetizioni del ciclo di amplificazione: 25-40 cicli; Ogni ciclo: denaturazione (95°C), di annealing (55-65°C), estensione (72°C);
3. Una estensione finale dopo i cicli di amplificazione: (72°C).

Note:

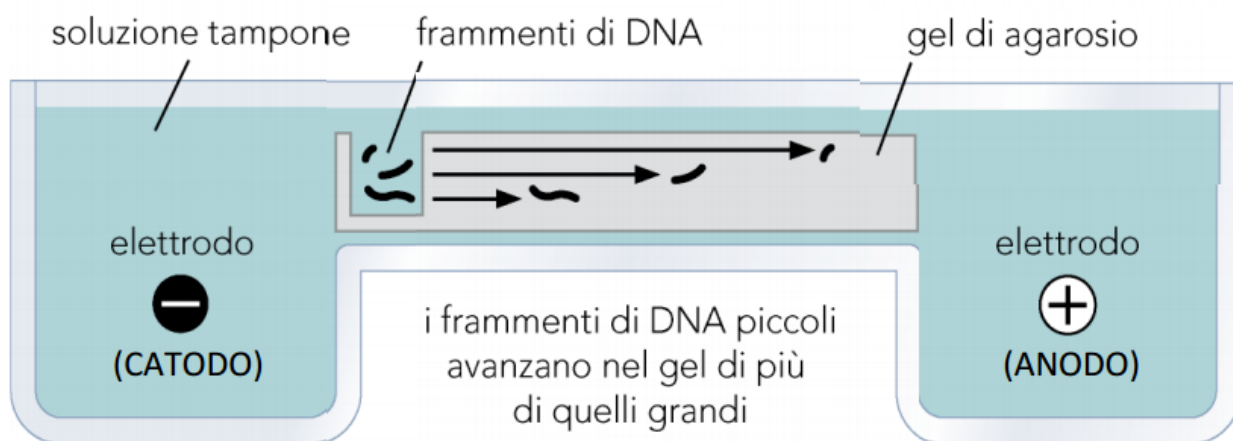
Per ottenere l'ottimizzazione del ciclo di PCR si possono variare alcuni parametri:

1. Non è indispensabile utilizzare una grande quantità di campione vista la natura esponenziale della reazione. In genere sono sufficienti quantità dell'ordine dei pg o ng. Al variare della quantità di DNA di partenza da amplificare è possibile variare il numero di cicli che saranno effettuati dal termociclatore (normalmente fra i 25 ed i 40 cicli);
2. La concentrazione di $MgCl_2$ nella reazione è una variabile importante. All'aumentare della sua concentrazione si aumenta l'efficienza della reazione ma contemporaneamente diminuisce la specificità. L'intervallo ottimale è compreso fra 1 e 6 mM nella miscela finale. Generalmente si utilizza una concentrazione 1,5 mM;
3. La temperatura ed il tempo di denaturazione non è determinante e può essere mantenuto costante;
4. La temperatura di annealing è una variabile molto importante e dipende dal tipo di sequenza e dalla lunghezza dei primers. Quando un primer con una determinata sequenza nucleotidica appaia in una regione perfettamente complementare del DNA genomico presenta una stabilità migliore rispetto ad un appaiamento non perfettamente complementare. Pertanto le condizioni di specificità ottimali si ottengono utilizzando primers con una temperatura di annealing di poco inferiore alla temperatura di melting, ovvero quella temperatura alla quale i primers si staccano dalla sequenza complementare;
5. La temperatura di estensione di un frammento di DNA è di 72°C ed è costante poiché questa è la condizione ottimale per la *Taq* Polimerasi normalmente utilizzata; essa può variare però al variare della polimerasi utilizzata. Il tempo è invece un parametro che dipende dalla lunghezza del frammento da amplificare. Normalmente il tempo di estensione è di 30'' -1' a seconda della lunghezza del frammento e della processività del tipo di *Taq* utilizzata. In genere per frammenti di 300-500 nucleotidi si impostano 30'' di estensione, mentre per frammenti di 1 kb è necessario 1 minuto;

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

Lavoro preliminare:

- Allestire le postazioni lavoro
- Guardare video sull'utilizzo delle micropipette
- Guardare video Tutorial sull'utilizzo relativo al protocollo
- Collegare la MiniPCR ad un PC o ad uno smartphone e scaricare il programma o l'applicazione
- Organizzazione del lavoro: In ogni classe si esegue un esperimento. Suddividere i ragazzi in 5 gruppi di lavoro ciascuno dei quali seguirà l'amplificazione di uno dei 5 DNA.
- Fare effettuare prove di pipettata con acqua ai ragazzi prima di iniziare l'esperimento

FASE 1: Reazione di PCR del locus TH01

Materiale messo a disposizione per ciascuna classe:

- MASTER MIX (contenente tutti i componenti necessari alla reazione di PCR quali Tampone, dNTPs, l'enzima Taq polimerasi)
- Primers specifici per il locus TH01
- DNA X (quello ritrovato sulla scena del crimine)
- DNA del sospettato A
- DNA del sospettato B
- DNA del sospettato C
- DNA del sospettato D

Lavoro eseguito dall'insegnante appena prima di iniziare l'esperimento

- Centrifugare per 10 secondi tutte le provette in modo da raccogliere il volume sul fondo della provetta
- All'interno della Valigia è presente una micropipetta di precisione chiamata p2 che deve essere utilizzata solo dall'insegnante nella fase di completamento della master mix come segue: utilizzando la p2 **trasferire con molta cura 1.8 µl del primer TH01 nella provetta contenente la Master Mix**. Miscelare bene fino a quando la soluzione diventa azzurra omogenea.
- Consegnare a ciascun gruppo un tipo di DNA
- La provetta contenente Master Mix con il primer viene fatta passare da un gruppo all'altro.

Procedimento eseguito da ciascun gruppo:

- Prendere una provetta piccola per PCR e posizionarla su un idoneo porta-provette. Siglare sul tappo e sul lato il tipo di DNA (ad esempio DNA X)
- Mettere all'interno della provetta (sul fondo) **15 µl di Master mix** (utilizzare la micropipetta p50)
- Aggiungere **15 µl del DNA** (utilizzando la micropipetta p50)
- Chiudere accuratamente la provetta e consegnarla al docente. Quando tutte le 5 provette sono state raccolte si procederà ad una breve centrifugata prima di avviare il termociclatore (vedi Video Tutorial) per ottenere il DNA amplificato corrispondente alla regione STR TH01 per ciascun DNA.
- Riordinare le postazioni di lavoro (chiudere le scatole di puntali e provette)
- La reazione di PCR sarà completata in circa 2 ore di tempo

PROGRAMMA DI PCR

94°C, 2 MIN

94°C 30 SEC	}	39 CICLI
52°C 30 SEC		
72°C 40 SEC		

72°C 5 MIN

FASE 2: Elettroforesi su gel di agarosio per analizzare i prodotti di PCR

- 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 2% 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.
- Preparare la vaschetta elettroforetica con i pettini. N.B. si consiglia di sigillare le estremità aperte della vaschetta con del nastro carta prima di posizionarlo all'interno della vaschetta più grande dove verrà colato il gel.
- Pesare quindi 1 g di agarosio, porli nella beuta di vetro, aggiungere 50 ml di tampone e portare ad ebollizione nel microonde (non prolungare la fase di ebollizione, sono sufficienti circa 10-15 secondi di ebollizione).
- 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:
- Togliere il nastro adesivo dalla vaschetta.
- Inserire la vaschetta nella cameretta elettroforetica.
- Aggiungere 350 ml di tampone TAE 1X.
- Aggiungere in ciascun campione di PCR **6 µl di 6X LD** (battere la provetta sul tavolo per miscelare il campione).
- Caricare 10 µl di ciascun campione per pozzetto seguendo lo schema sotto riportato e le indicazioni riportate nel video tutorial
- Avviare la corsa elettroforetica come indicato dagli insegnanti **a 135 V costanti circa 30 minuti.**
- Prendere nota dell'ordine di caricamento. Ecco un esempio di ordine di caricamento. Per l'analisi dell'esperimento è sufficiente caricare fino alla posizione 5. Tutti gli altri campioni sono ripetizioni per consentire di estendere l'esperienza di caricamento a tutti gli studenti.

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

- Al termine della corsa spegnere la corrente, 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).

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?
- FARE UNA STIMA, ANCHE SE APPROSSIMATA DELLE DIMENSIONI DEI FRAMMENTI AMPLIFICATI (IN TERMINI DI NUMERO DI NUCLEOTIDI) CONOSCENDO LA MAPPA DEL MARKER DI PESO MOLECOLARE (vedi immagine sotto)

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

