

DNA Profiling e Genetica Forense

Laurea Magistrale in Scienze Biomolecolari e
dell'Evoluzione

Curriculum: BIODIVERSITA' ED EVOLUZIONE

Dr.ssa MAMOLINI ELISABETTA

mme@unife.it

SVEB (sez. Biologia ed Evoluzione)

primo piano (studio N° 19)

DNA Profiling e Genetica Forense

Testi di riferimento

- Introduzione alla genetica forense: Indagini di identificazione personale e di paternità. Adriano Tagliabracci- Springer (35 euro)
- Il test del DNA e la prova biologica di paternità e parentela. Marina Dobosz- PICCIN (18 euro)
- slides delle lezioni teoriche
- schede delle esercitazioni
- articoli



ESAME SCRITTO

DOMANDE: 5 aperte (4 programma teorico + 1 sulla parte sperimentale)

DURATA: 90 min (18 min/domanda)

PUNTEGGIO: max 6 punti/domanda

- in base al contenuto sia al linguaggio scientifico appropriato

ESITO: in 30/30 e la prova si ritiene superata con una votazione di almeno 18/30.

Presenza in laboratorio in relazione all'impegno e all'applicazione: 1-2 punti

E' POSSIBILE MIGLIORARE CON DOMANDE ORALI, LA VOTAZIONE DELLO SCRITTO
(A DISTANZA DI 1 SETTIMANA)

Informazioni: www.unife.it/sveb/lm.biomolecolari/insegnamenti/dna-profiling-e-genetica-forense

L'uomo e la sua curiosità...



L'uomo e la sua curiosità...

Mi piace imparare e penso che la curiosità sia un dono meraviglioso.

Andie MacDowell



La principale malattia dell'uomo è la curiosità irrequieta delle cose che non può sapere.

Blaise Pascal



L'uomo e la sua curiosità...



Curiosità sul bacio



Curiosità sul bacio

Ad ogni **french kiss** trasferiamo ~ **80 milioni di batteri!**

Microbioma popolano il tuo corpo e il passaggio di informazioni che avviene durante un bacio **va ad alterare**, pezzettino dopo pezzettino e in senso biologico, **il tuo apparato genetico.**

Lederberg: i **microorganismi** presenti nel corpo umano possono alterare il *sistema immunitario*, ma anche il *modo in cui ti comporti nella sfera sessuale o nell'ambiente che ti circonda.*

I microbi sono una delle ragioni per cui sei come sei, in senso biologico, e anche psicologico (**psico-biotica**: studia la correlazione tra batteri intestinali e mente)

L'empatia per gli animali è scritta nel DNA:

tutti coloro che mostrano un alto grado di cura per le specie animali, infatti, condividono **la stessa variazione del gene** che produce il **neurotrasmettitore ossitocina**, un ormone collegato a numerosi comportamenti e sentimenti umani, tra cui l'amore.





Curiosità

Einstein, Newton e altri geni... incapaci di insegnare

Non sempre le più grandi menti della storia umana hanno saputo trasmettere ai propri studenti i loro concetti, eccone alcuni esempi

Per Einstein: i calzini erano superflui;

Pitagora: odiava chi mangiava le fave;

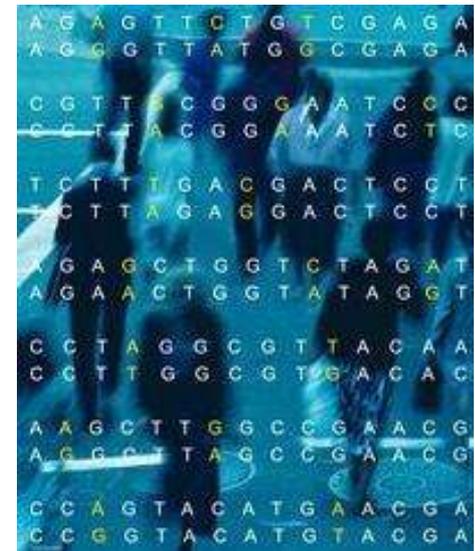
Balzac: beveva 50 caffè al giorno;

Beethoven: componeva soprattutto mentre si lavava

11 geni e le loro stranezze

VARIABILITA' DEL NOSTRO DNA

- Il DNA costituisce il Genoma umano
- Il genoma di ciascun individuo è **UNICO** ed è ereditato dai genitori
- Il genoma umano è dato da circa **3,2 miliardi di pb**



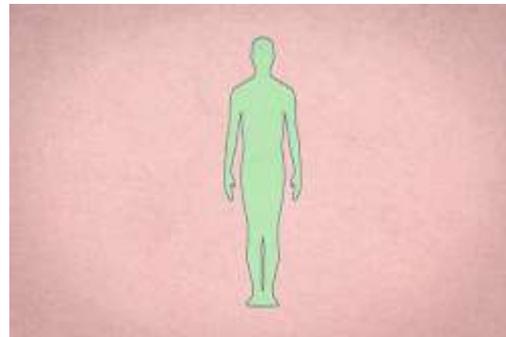
DNA-PROFILING'?

= Profilazione del DNA

= DIAGNOSI INDIVIDUALE

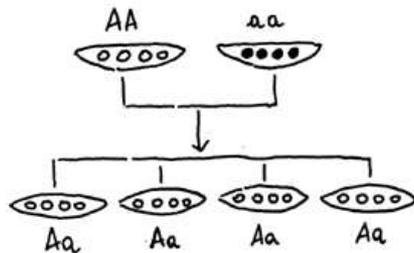
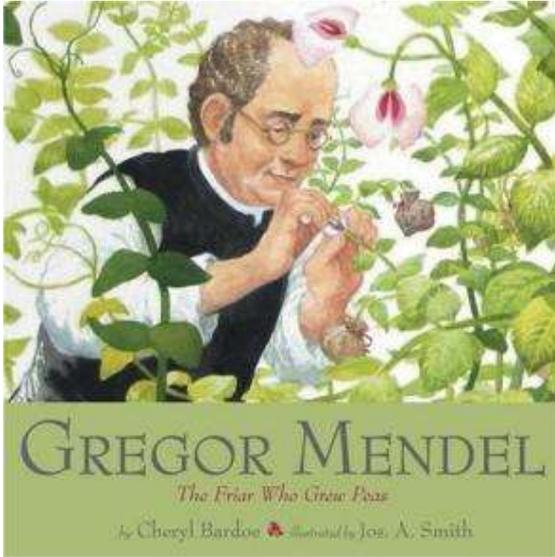
= UNICO GENOTIPO di OGNI INDIVIDUO

PROFILO GENETICO



"If you really are the same clean, charming man I married only a few years ago, then you won't mind taking a DNA test."

GENETICA FORENSE?



Applicazione della genetica classica
alle **tracce umane** e **non umane**

per la risoluzione di conflitti legali

(Jobling and Gill, 2004)





Scienze forensi : riguardano l'applicazione delle più moderne tecniche molecolari nel contesto legale, solitamente volta all'identificazione personale.

2006 James e Nordby: le branche delle scienze forensi...

Biologia: studio di tutte le forme viventi.

- Genetica
- Tossicologia
- Entomologia
- Botanica
- Antropologia
- Odontologia
- Psicologia e psichiatria
- Archeologia forense



- Geologia (fenomeni post-mortali ed il loro rapporto con il contesto ambientale geologico, mineralogico, fotointerpretazione, pedologia)
- Digital forensic
- Tafonomia (modalità della formazione di un fossile: si occupa dell'intera storia dell'organismo, dalla morte fino alla definitiva conservazione (trasferimento di materia biosfera → litosfera)).

biosfera

organismi autotrofi

organismi eterotrofi

luce solare e sostanze
inorganiche

sostanze organiche

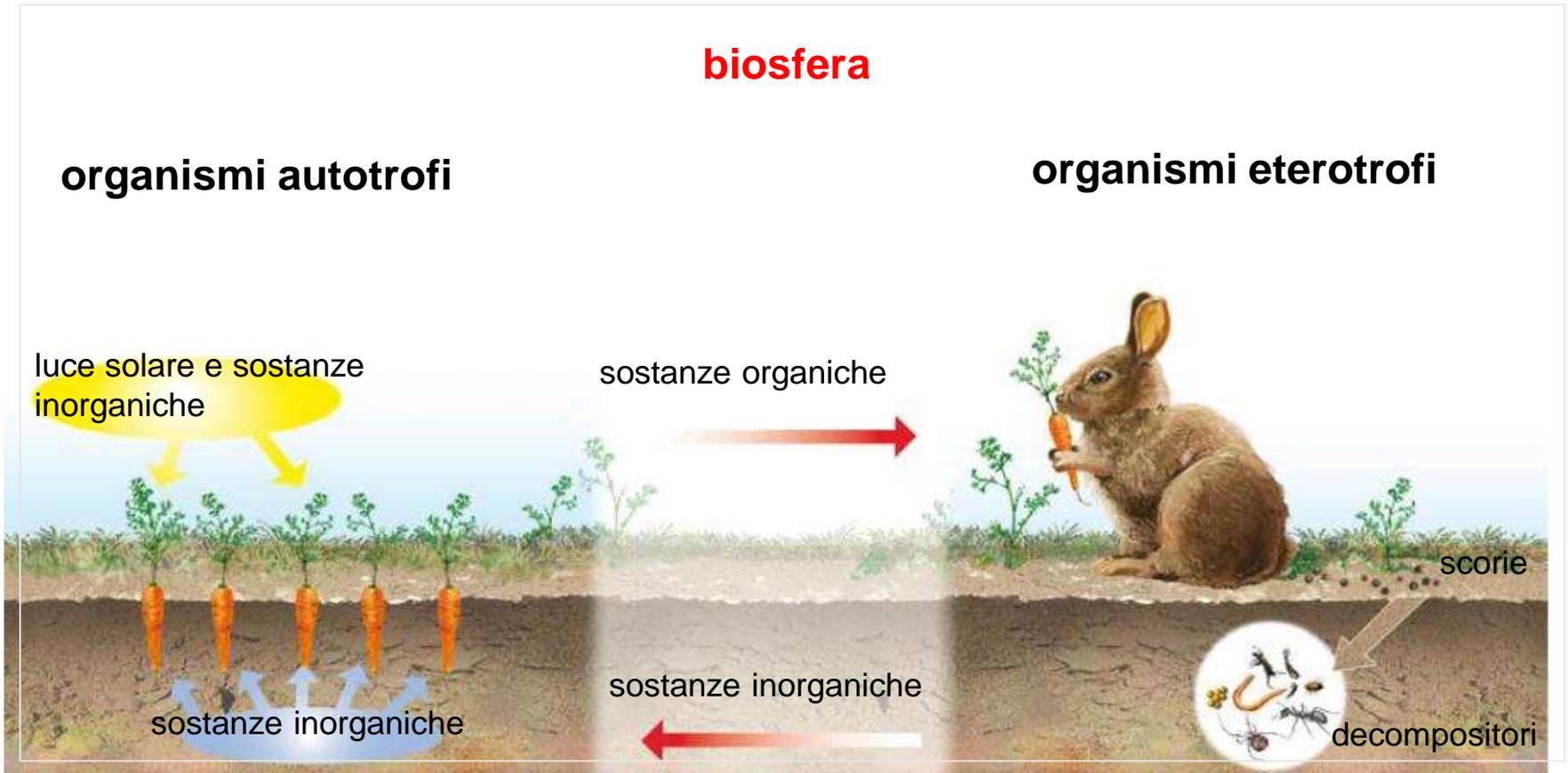
scorie

sostanze inorganiche

sostanze inorganiche

decompositori

litosfera



Scientificità

- A parità di efficacia ed efficienza, esecuzione corretta delle procedure più semplici e meno costose: adeguata professionalità di base.
- Unicità di linguaggio tecnico per le descrizioni.

Campi applicativi pratici

Scienze e Genetica Forense: specializzazione che sempre più attira i giovani laureati in *Biologia laurea in Biologia o in Biotecnologie (lauree che afferiscono all'Ordine dei Biologi)*,

→ *Scuola di specializzazione in Genetica Medica (l'accesso alle scuole di specializzazione è complesso e i posti sono pochissimi).*

In alternativa ci sono master di Genetica Forense, che sono molto utili.

Il percorso di studi è un percorso ben delineato e non si finisce mai di studiare.

Le applicazioni della Genetica Forense sono tante:

- 1) *casi di omicidio*
- 2) *casi di sequestro di persona*
- 3) *disastri di massa (11 settembre a New York con più di duemila persone che dovevano essere in qualche modo restituite alle famiglie)*
- 4) *accertamenti e disconoscimenti di paternità.*
- 5) *episodi di malasanità*
- 6) *Settore antropologico (SNP) si riesce a stabilire l'etnia delle persone, il colore dei capelli e il colore degli occhi.*

Metodi di repertazione

**I reperti
possono:**

- Dimostrare che è stato commesso un crimine
- Collegare un sospetto alla vittima o al luogo del crimine
- Stabilire l'identità delle persone che hanno commesso il reato
- Stabilire la dinamica dell'evento
- Scagionare un innocente
- Confermare la deposizione della vittima o di un teste
- Indurre il sospettato a fare delle ammissioni o addirittura confessare

REPERTARE

Ritrovare *prove, indizi;*

Nel linguaggio medico: riscontrare,
constatare obiettivamente:

r. in un cadavere tracce di veleno.

Metodi di repertazione

**I reperti
possono:**

→ Dimostrare che è stato commesso un crimine

→ Collegare un sospetto alla vittima o al luogo del crimine

→ Stabilire l'identità delle persone
che hanno commesso il reato

→ Stabilire la dinamica dell'evento

→ Scagionare un innocente

→ Confermare la deposizione della vittima o di un teste

→ Indurre il sospettato a fare delle ammissioni
o addirittura confessare

Cos'è un criminale?? E un crimine??

Criminale è un soggetto che viola regole o leggi

Crimine è l'attività in cui si manifestano violazioni di regole o leggi, per le quali un'autorità costituita può in ultima analisi prescrivere una pena.

La scena del crimine....

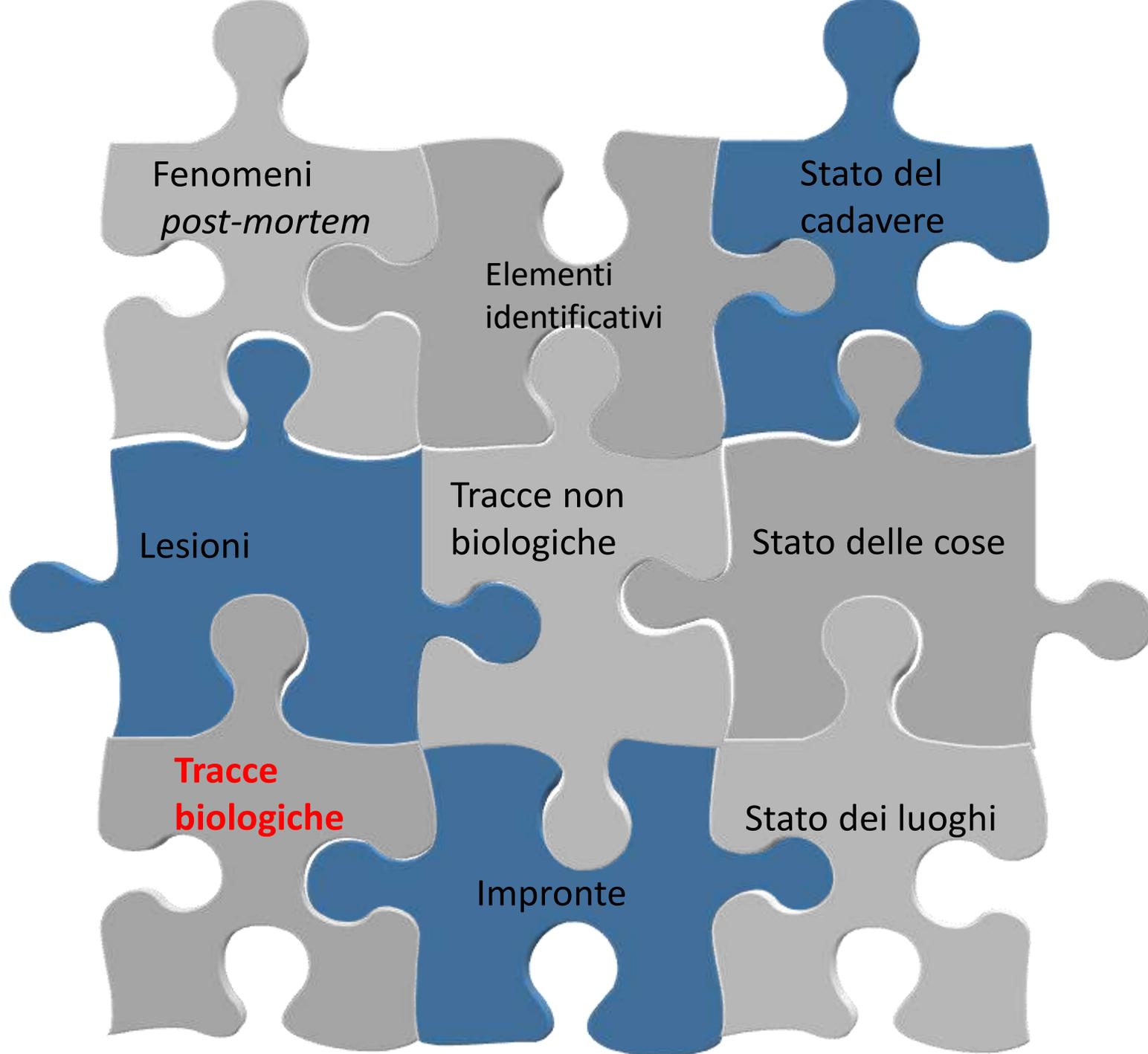
Innanzi tutto la scena del crimine non deve necessariamente sottintendere un delitto sanguinario.



Metodi di repertazione

I reperti
possono:

- Dimostrare che è stato commesso un crimine
- Collegare un sospetto alla vittima o al luogo del crimine
- Stabilire l'identità delle persone che hanno commesso il reato
- Stabilire la dinamica dell'evento
- Scagionare un innocente
- Confermare la deposizione della vittima o di un teste
- Indurre il sospettato a fare delle ammissioni o addirittura confessare



L'approccio integrato: genetica e scienze forensi

- Considerando solo una sola disciplina si rischia di parzializzare le informazioni scientifico-forensi
- **PERICOLO**: valutare la dinamica di un dato atto delittuoso oggetto di indagine in modo parziale
- Nel corso del dibattimento è di fondamentale importanza garantire sempre l'originalità e l'unicità dei reperti raccolti in fase di sopralluogo

TEORIA DELL'INTERSCAMBIO

[Locard, 1923-1930]



Luogo e cose

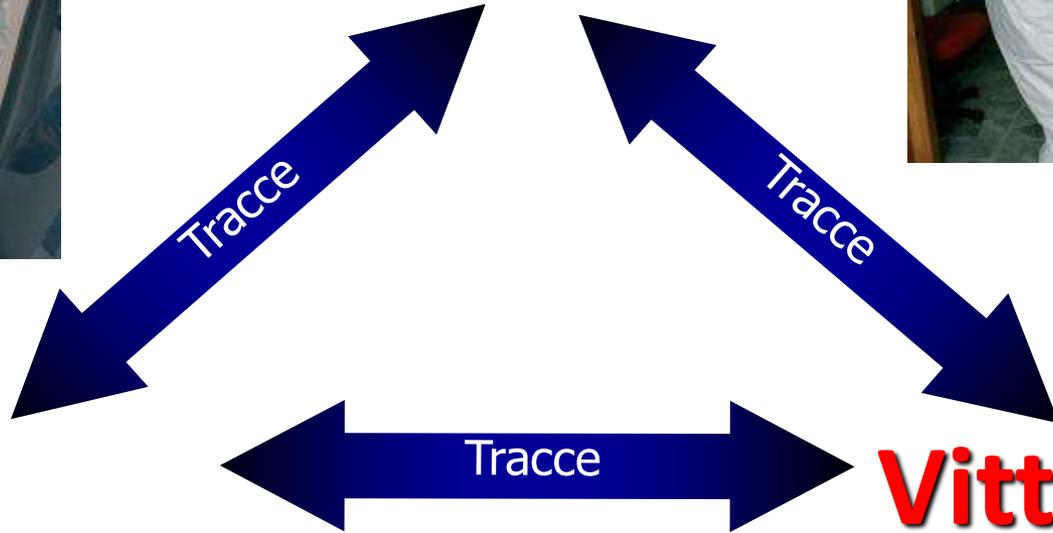
Reo

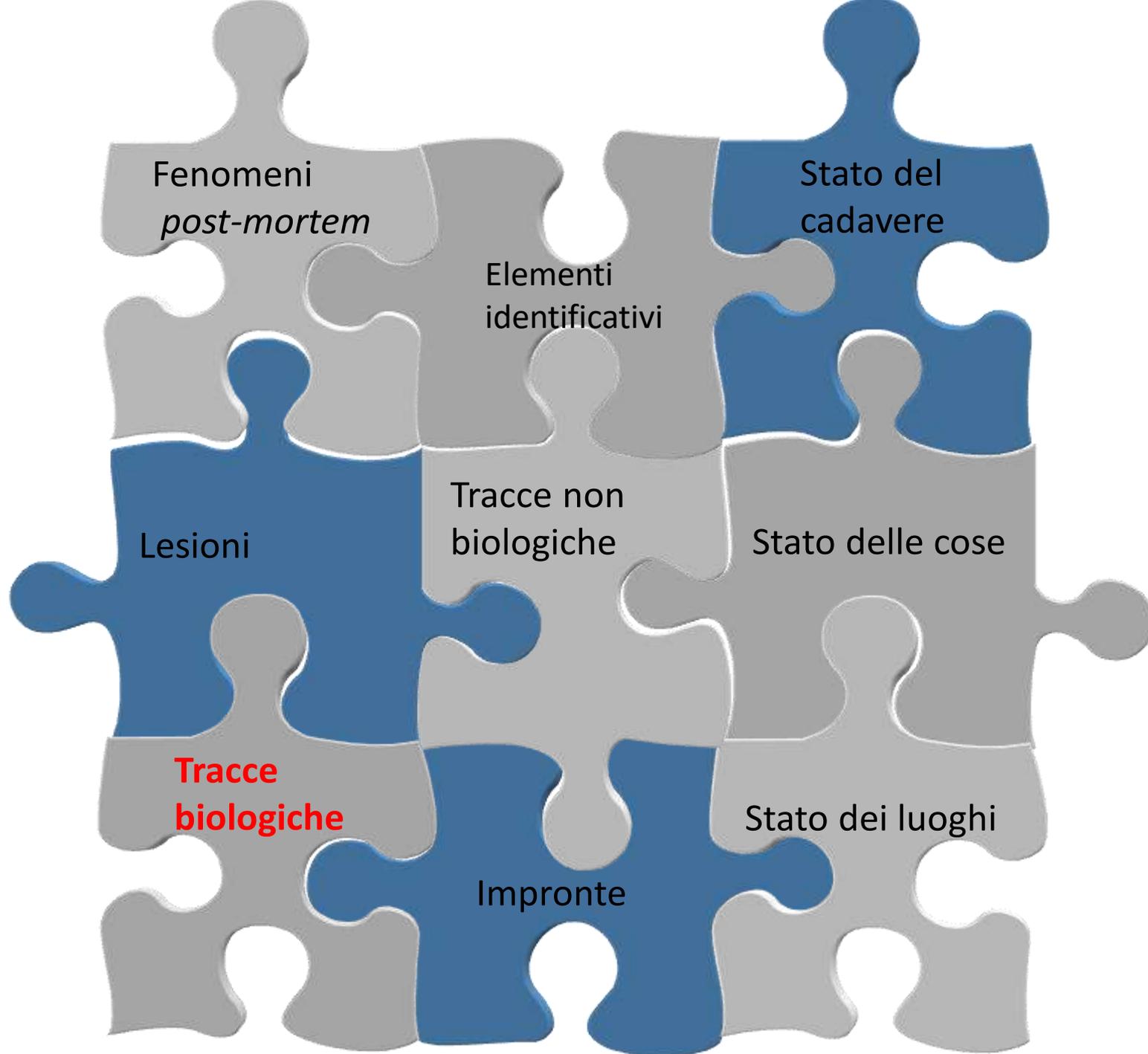
Vittima

Tracce

Tracce

Tracce





LA RICERCA DELLE TRACCE BIOLOGICHE

Deposizione

Scavo/museo

Laboratorio

TEMPO

DNA antico

DNA vecchio

DNA moderno



Jakisch et al. BMC Res Notes (2016) 9:348
DOI 10.1186/s13104-016-2147-7

BMC Research Notes

RESEARCH ARTICLE

Open Access

DNA analysis of molluscs from a museum wet collection: a comparison of different extraction methods

Katharina Jakisch^{1,2*}, Anita Eschner³, Thomas V. Rintelen⁴ and Elisabeth Ha



Forensic Science International: Genetics 40 (2018) 52–63

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bsigen



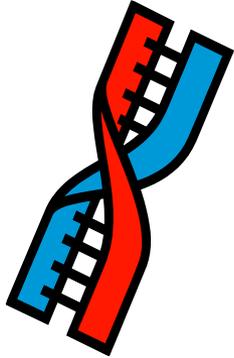
Research paper

The Yara Gambirasio case: Combining evidence in a complex DNA mixture case

Therese Graversen¹, Julia Mortera², Giampietro Lago³



LA RICERCA DELLE TRACCE BIOLOGICHE



SUL CORPO

Corretta
conservazione
delle prove →
**Sì Catena di
custodia**

SUL CORPO CHE VIENE RINVENUTO
DOPO UN PO' DI TEMPO

NON è stato possibile
effettuare una corretta
conservazione delle prove →
NO catena di custodia

Modalità di Raccolta del Campione Biologico

- ✓ Catena di custodia dei reperti:
processo atto a garantire
AUTENTICITÀ,
INTEGRITÀ
TRACCIABILITÀ
del campione dal prelievo allo smaltimento
- ✓ Controcampione (per eventuale analisi di revisione)

CATENA DELLA CUSTODIA dei reperti

Rende tracciabile ogni movimento del campione

Le informazioni sono:

- identificatore univoco, per il verbale di prelievo e per i campioni (solitamente si usa una etichetta con codice a barre);
- informazioni sul campione (a cura della struttura di provenienza e a quella di ricezione);
- nome, indirizzo, e numero di telefono del laboratorio d'analisi;
- data e ora della raccolta;
- nome e firma di tutte le persone che hanno avuto in custodia il campione durante tutti i vari processi di raccolta dello stesso.

CATENA DELLA CUSTODIA dei reperti



CATENA DELLA CUSTODIA dei reperti

Le tracce biologiche si conservano (riducono il tasso di crescita batterica e la degradazione del DNA) se:

- 1) essiccate
- 2) poste in ambiente freddo (+4°C per breve tempo, – 20°C per lungo tempo oppure a – 80 °C).

LA RICERCA DELLE TRACCE BIOLOGICHE

TABLE 1 Possible sources of DNA from samples encountered at crime scenes

Biological material	Source
Blood	White blood cells.
Semen	Spermatozoa and cells shed during ejaculation.
Vaginal secretions	Cells shed from the vaginal lining. Secretions may be found on the outside of condoms or penile swabs.
Saliva	Cheek (buccal) cells from the inside of the mouth. Saliva may be found on drinking vessels, cigarette butts, masks, stamps, envelopes and food.
Hair	Cells found attached to the root of plucked hair or adhering to the shaft of the hair. There are many more cells attached to the root of the hair than the shaft. (See, for further explanation, Ch 88B <i>The forensic examination of hairs</i> by Dr James Robertson)
Sweat/skin	Skin cells which have sloughed off the body due to normal regeneration processes. Also “naked” DNA released from the cell during cellular breakdown. Found on clothing, touched items and personal items. Also referred to as “trace DNA” or “contact DNA”.
Bone	Cells present in the marrow.
Tissue	Cells present particularly in muscle tissue.
Teeth	Cells present in the tooth pulp.
Urine/faeces/vomit	Cells present in these fluids, if any, are thought to originate from the lining of the orifice from which they came. Often difficult to analyse as bacteria degrades the DNA.



LA RICERCA DELLE TRACCE BIOLOGICHE

DNA content of biological samples:

Type of sample	Amount of DNA
Blood	30,000 ng/mL
stain 1 cm ² in area	200 ng
stain 1 mm ² in area	2 ng
Semen	250,000 ng/mL
Postcoital vaginal swab	0 - 3,000 ng
Hair	
plucked	1 - 750 ng/hair
shed	1 - 12 ng/hair
Saliva	5,000 ng/mL
Urine	1 - 20 ng/mL



ISSN: 0975-833X

Available online at <http://www.journalcra.com>

International Journal of Current Research
Vol. 8, Issue, 02, pp.26093-26097, February, 2016

**INTERNATIONAL JOURNAL
OF CURRENT RESEARCH**

REVIEW ARTICLE

TOUCH DNA: AN INVESTIGATIVE TOOL IN FORENSIC SCIENCE

***Sowmya, T.**

Forensic Science Unit, University College of Science, Osmania University, Hyderabad – 500007, Telangana, India

ARTICLE INFO

Article History:

Received 18th November, 2015

Received in revised form

05th December, 2015

Accepted 25th January, 2016

Published online 14th February, 2016

Key words:

ABSTRACT

Forensic Science is a multidisciplinary science which helps in crime investigation. To link a suspect to a crime, DNA analysis has been playing a key role. According to the Locard's exchange principle, when a suspect comes in contact with the crime scene, there is a transfer of evidence from the crime scene to the suspect and vice-versa. The suspect tends to leave the epithelial skin cells containing traces of his DNA on the surface which he comes in contact with. This DNA is referred to as touch DNA and can help in identification of the suspect involved in the crime. In crimes where identification of the suspect has proved to be a potential challenge for investigators, touch DNA has been an effective investigative tool. The present work throws light on the importance of touch DNA in

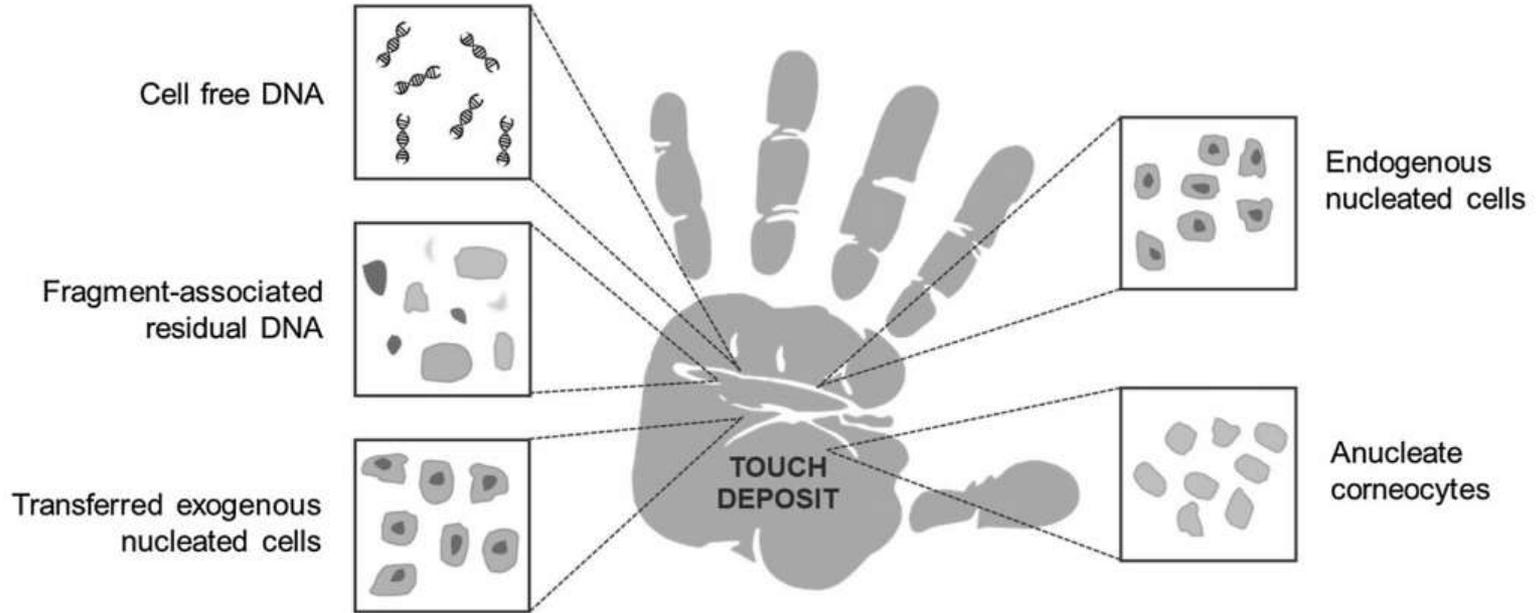


Fig. 1. Concept map of potential sources of DNA deposited by touch/handling. It is currently well established that individuals may leave behind detectable DNA when they handle items, but the anatomical origin of that DNA remains unsolved. It is possible that the DNA typically recovered from handled items in forensic scenarios comes from nucleated cells from hands, anucleate cells from hands, nucleated cells transferred onto hands from elsewhere, residual cell fragments (including free nuclei) from hands or from outside a cellular architecture in sweat on hands or residual transferred body fluids.

LA RICERCA DELLE TRACCE BIOLOGICHE

Altri oggetti potenziali fonti di DNA

DNA per contatto = da poche a 50 cellule

- Impronte digitali;
- colletti di camicie, maglie, indumenti in genere;
- passamontagna, caschi da moto;
- orologi, anelli, stanghette di occhiali;
- oggetti impugnati, matite, penne, armi bianche, armi da fuoco ecc.





Low Template DNA: Tad, Touch and Traces

Jack Evans and Sibte Hadi*

School of Forensic and Applied Sciences, University of Central Lancashire, Preston, UK

*Corresponding author: Sibte Hadi, School of Forensic and Applied Sciences, University of Central Lancashire, Preston, UK, E-mail: shadi@uclan.ac.uk

Received date: October 03, 2018 Accepted date: October 15, 2018 Published date: October 22, 2018

Copyright: ©2018 Evans J, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Small amounts of DNA, typically less than 100 pg, termed Low Template (LT) DNA which is extremely useful in forensic casework. The current advancement of highly sensitive multiplex PCR systems consisting of short tandem repeat (STR) markers have allowed the development of genetic profiles from much lower quantities of DNA, from such samples. However, this sensitivity of the STR profiling systems also leads to issues of secondary transfer of LT DNA such as the implication of innocent parties as a result of background contamination and profiles having artefacts due to stochastic effects. This review explores the varying deposition mechanisms, technological advancements in both collection and analysis, and ultimately evaluates the usefulness of LT DNA considering its admissibility as forensic evidence.

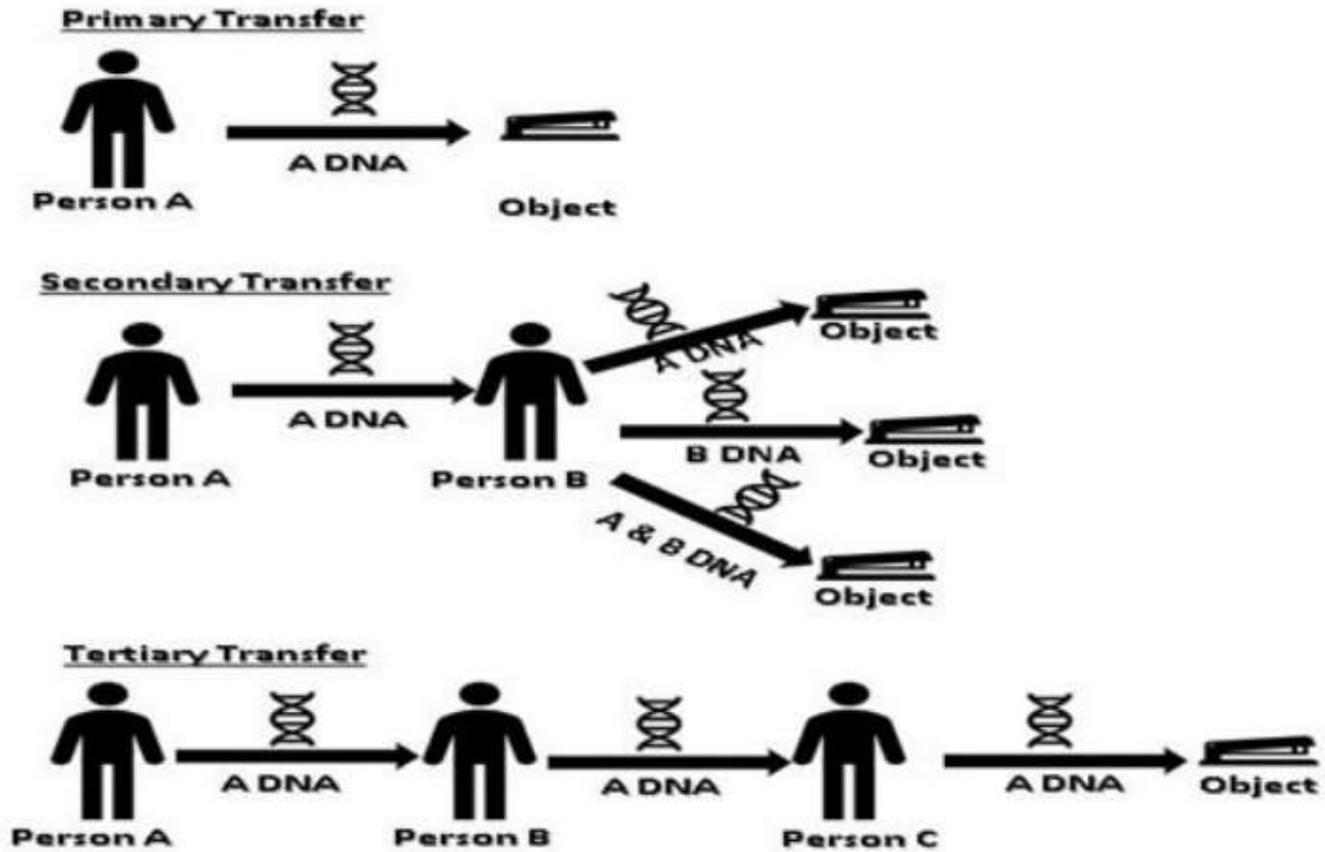


Figure 1: Illustration of primary, secondary and tertiary DNA transfer mechanisms

LA RICERCA DELLE TRACCE BIOLOGICHE

TABLE 2 Approximate success rates of DNA analysis for various types of biological material as determined from crime scene samples

Biological material	Approximate success rate	
Blood	90 per cent	
Semen	90 per cent	
Saliva	Bottle – drink	40 per cent
	Bottle – alcohol	25 per cent
	Cigarette butt	70 per cent
Trace/Contact	Clothing	30 per cent
	Objects – extended contact eg mobile phone	15 per cent
	Objects – limited contact eg handles	10 per cent
	Objects – single contact eg smudge marks	<10 per cent
	Hair	25 per cent



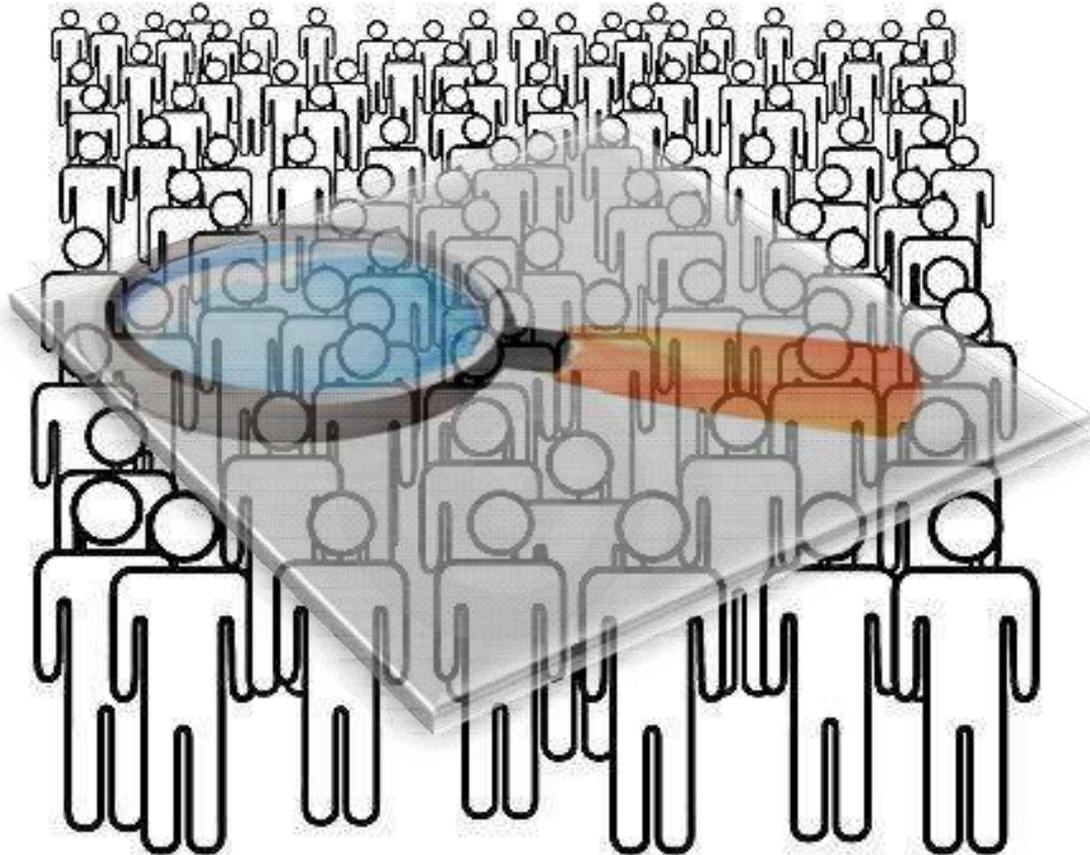
Metodi di repertazione

**I reperti
possono:**

- Dimostrare che è stato commesso un crimine
- Collegare un sospetto alla vittima o al luogo del crimine
- Stabilire l'identità delle persone che hanno commesso il reato
- Stabilire la dinamica dell'evento
- Scagionare un innocente
- Confermare la deposizione della vittima o di un teste
- Indurre il sospettato a fare delle ammissioni o addirittura confessare

DIAGNOSI GENETICA FORENSE →

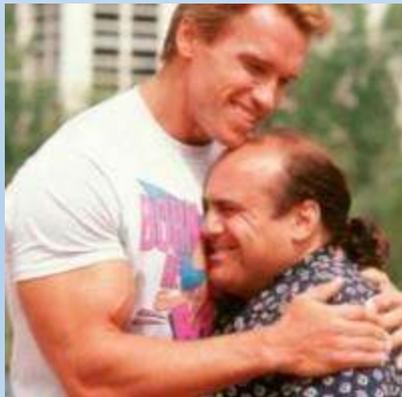
identificazione personale e di poter distinguere un individuo da un altro, con significatività statistica.



DIAGNOSI GENETICA FORENSE



DIVERSITA' GENETICA → polimorfismo (1%)



Arnold Schwarzenegger e Danny De Vito nel film Gemelli (1988)

Diagnosi Genetica Forense

Sistemi tradizionali

1. polimorfismi degli antigeni eritrocitari ABO
2. Sistema RH
3. polimorfismi delle proteine sieriche

Sistemi basati sul DNA

--> marcatori molecolari

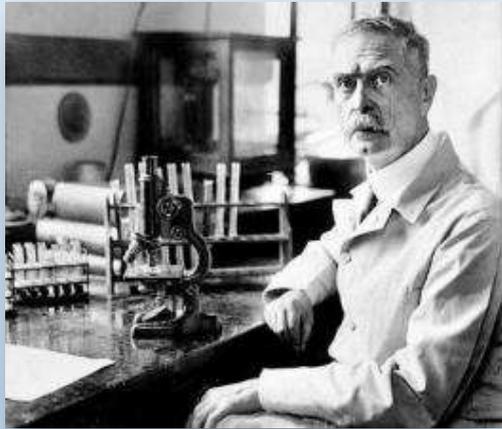
Diagnosi Genetica Forense

Sistemi tradizionali

1. polimorfismi degli antigeni eritrocitari ABO
2. Sistema RH
3. polimorfismi delle proteine sieriche

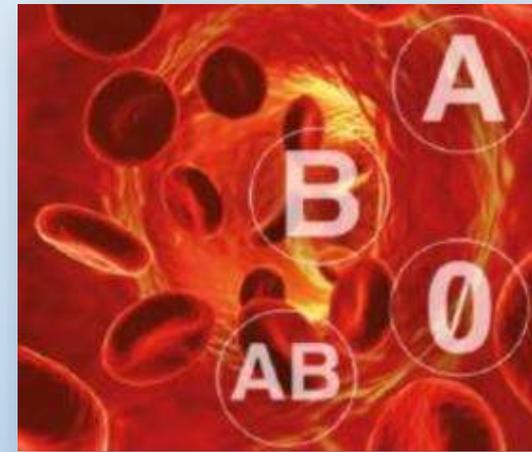
Diagnosi GENETICA FORENSE

1900 – Scoperta dei gruppi sanguigni ABO (Karl Landsteiner)



a) Indagini per l'identificazione personale di tracce e resti biologici umani ;

b) ricerca della paternità



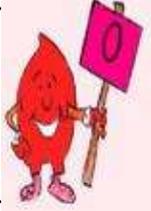
1° sistema polimorfico usato nelle scienze forensi

Alleli multipli

Per alcuni geni, in un gruppo di individui sono presenti più di due alleli, definiti anche *serie allelica*

Il genotipo di ciascun individuo diploide è comunque sempre costituito da 2 alleli

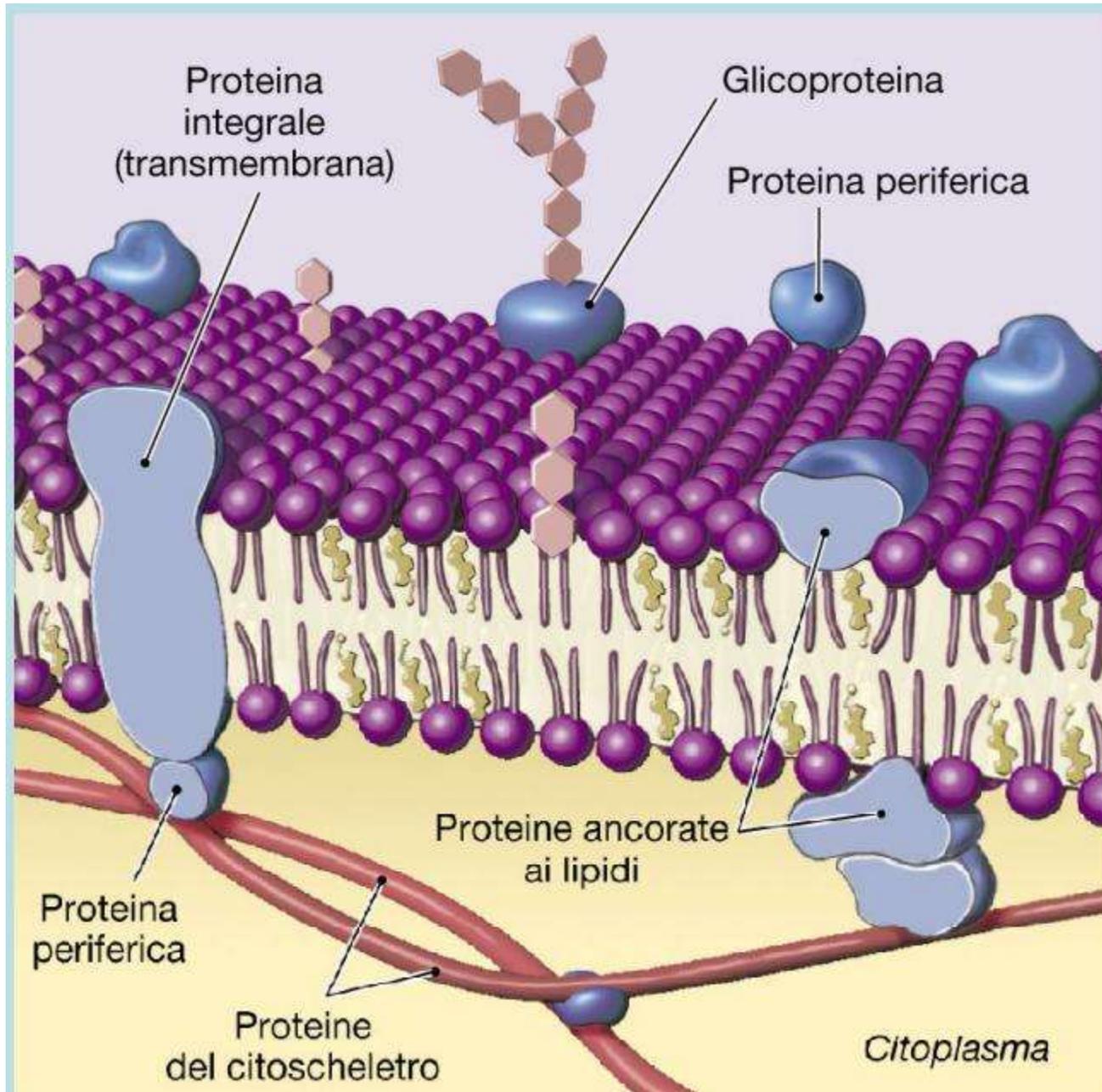
$I^A > i$; $I^B > i$; I^A e I^B codominanti fra loro

Fenotipo	Genotipi
	$i i$
	$I^A I^A$ $I^A i$
	$I^B I^B$ $I^B i$
	$I^A I^B$

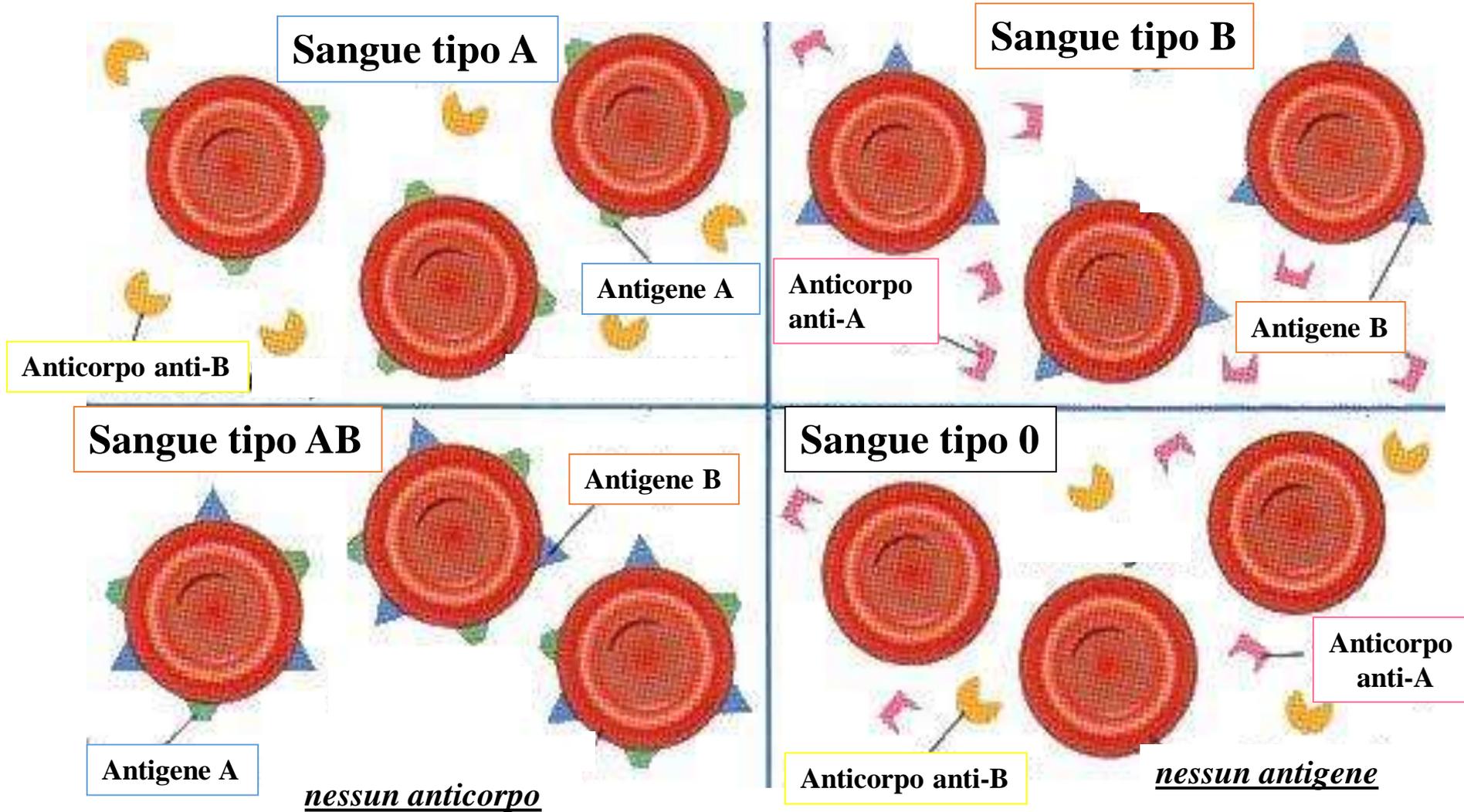
I gruppi sanguigni

Vengono distinti in base alla presenza o meno, sul globulo rosso, di determinate glicoproteine dette antigeni (Ag), e di determinate agglutinine plasmatiche (Anticorpi, Ab)

Gli Ab sono capaci di distruggere in vitro e in vivo i globuli rossi contenenti Ag di gruppo diverso, tramite una reazione di aggregazione (agglutinazione)



Antigens and Antibodies of ABO Blood Types



gruppo sanguigno	antigeni	può donare a	può ricevere da
AB		→ AB	AB ← A ← B ← 0 ←

A		→ AB → A	AB ← A ← 0 ←
----------	---	-------------	--------------------

B		→ AB → B	AB ← B ← 0 ←
----------	---	-------------	--------------------

0		→ AB → A → B → 0	0 ←
----------	---	---------------------------	-----

gruppo sanguigno

Rh +

Rh -

AB
A,B,0



	A	B	AB	0
<i>Italia settentrionale</i>	46 %	10,5 %	4 %	39,5 %
<i>Italia centrale</i>	38 %	14 %	3 %	45 %
<i>Italia meridionale</i>	35 %	15 %	4,5 %	45,5 %
<i>Sardegna</i>	29,5 %	8 %	2 %	60,5 %

Casi di Lattes (1916)

1) Un uomo è tornato a casa da un viaggio in un'altra città con delle macchie di sangue sulla camicia, pertanto sua moglie lo ha accusato di *adulterio*.

L'uomo è andato all'istituto medico legale: Lattes ha testato le macchie, determinando che esse erano umane, ma dello stesso gruppo ABO dell'uomo (tipo O) → pace in questa famiglia.

2) Un uomo era sospettato di un *omicidio* (macchie di sangue di tipo O sul suo cappotto):

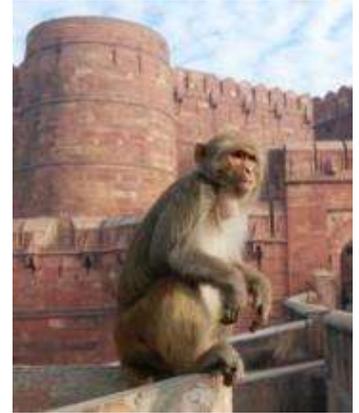
lui sosteneva che era il risultato di una perdita di sangue dal naso; la vittima era tipo A (AO), pertanto tali analisi hanno esonerato il sospetto.

Diagnosi Genetica Forense

Sistemi tradizionali

1. polimorfismi degli antigeni eritrocitari ABO
2. Sistema RH
3. polimorfismi delle proteine sieriche

Fattore Rh (1940)



Macaco Rhesus
(Macaca mulatta)

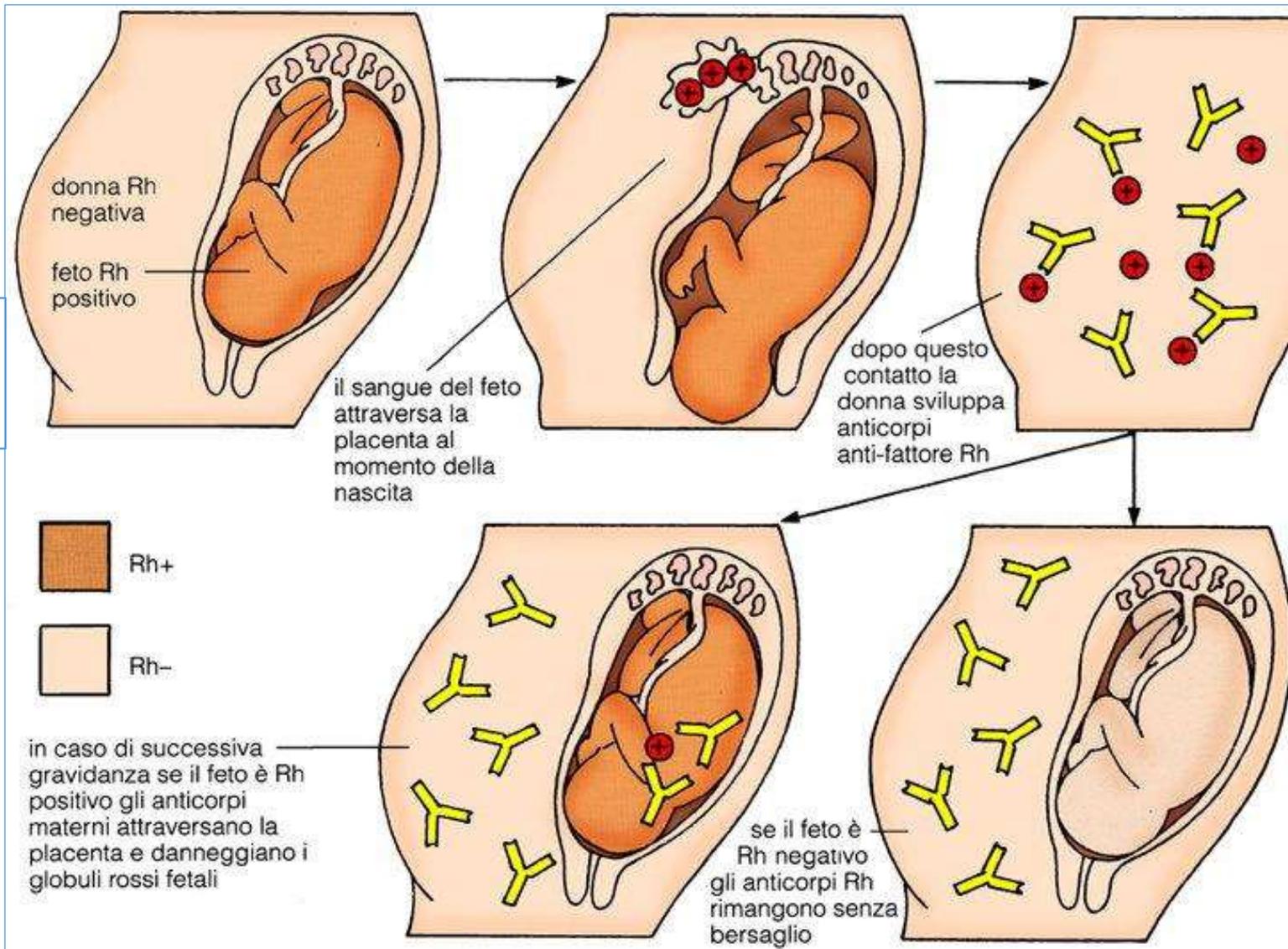
Landsteiner e
Wiener

- Fattore Rh: circa l'85% della popolazione possiede antigeni sui globuli rossi
→ nel trasfuso compaiono Ab anti Rh
- Questo fattore è determinato da più di 12 Ag anche se alcuni sono rari
- I più comuni sono denominati **C**, **D**, **E**:
 - Rh^+ in cui è presente (DD; Dd) (85%)
 - Rh^- in cui manca (dd) (15%)

INCOMPATIBILITA' MATERNO-FETALE

Rh^+ : DD; Dd

Rh^- : dd



DIAGNOSI GENETICA FORENSE

>1945 – Estensione delle conoscenze genetiche per un utilizzo nel sistema penale più consapevole

1. Necessità di utilizzare metodi molto costosi
2. Tempi lunghi di isolamento
3. Scarsa sensibilità dei metodi
4. Deteriorabilità dei marcatori (utilizzo di materiali freschi)
5. Scarsa affidabilità dei metodi statistici

Diagnosi Genetica Forense

Sistemi tradizionali

1. polimorfismi degli antigeni eritrocitari ABO
2. Sistema RH
3. polimorfismi delle proteine sieriche

DIAGNOSI GENETICA FORENSE

- **1° metodo molecolare impiegato per l'identificazione di specie (1966)**

1. Omogenizzazione dei tessuti



Lisi cellulare e fuoriuscita degli enzimi

2. Il surnatante viene fatto correre in un gel

3. Ciascuna proteina migra in una DIREZIONE e ad una VELOCITA' che dipendono dal rapporto : carica netta e massa.

4. Visualizzazione tramite elettroferogramma grazie a marcatura degli enzimi con sonde colorate.

Analisi di proteine – elettroforesi proteica

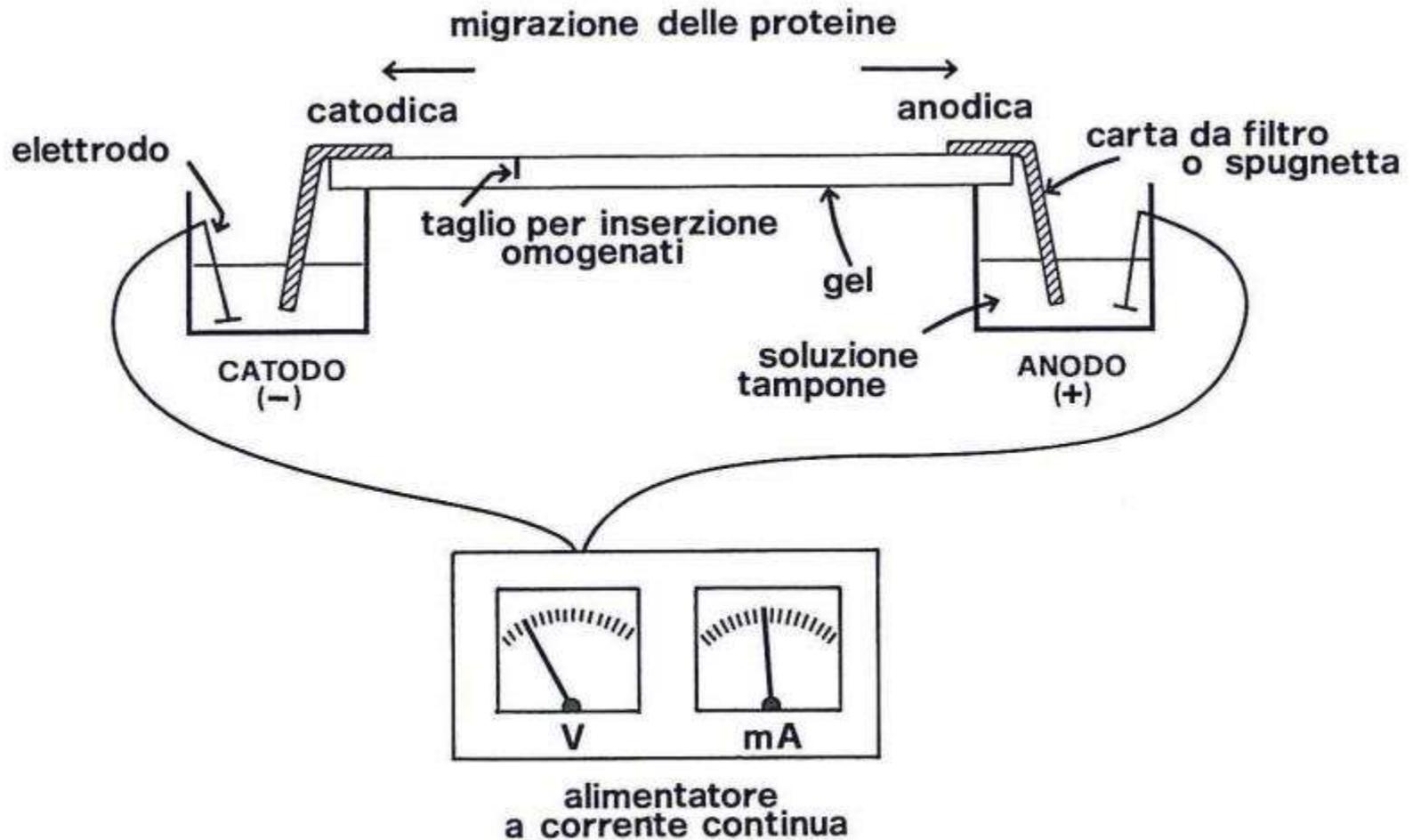


Fig. 1 - Schema di apparato per elettroforesi.

DIAGNOSI GENETICA FORENSE

- **1° metodo molecolare impiegato per l'identificazione di specie (1966)**

Gli isoenzimi (isozimi) sono enzimi che catalizzano la stessa reazione, ma hanno una struttura chimica differente: le differenze (ALLOZIMI) (hanno diversi aa) **vengono espresse con differenti pH, punto isoelettrico e mobilità elettroforetica.**

Possono essere presenti in una stessa specie animale o vegetale, o anche in uno stesso organismo a livello di distretti cellulari differenti.

Possono derivare da geni differenti oppure da modificazioni post-traduzionali

Elettroforesi di ISOZIMI e ALLOZIMI

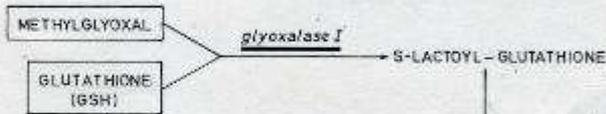
4.4.1.5—Glyoxalase I (GLO)

also known as lactoyl-glutathione lyase (EC preferred).

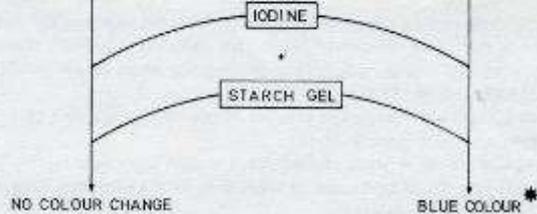
S-Lactoyl-glutathione = glutathione + methylglyoxal

Staining system

Stage 1. enzyme action:

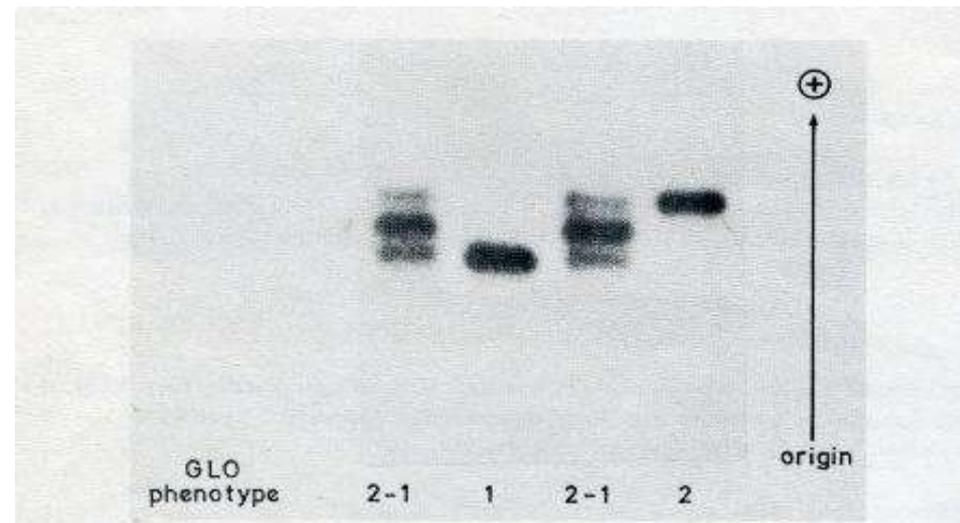


Stage 2. counterstain:



L'intensità delle bande è diversificata in funzione del contributo di ciascun allozima all'attività enzimatica totale: i rapporti d'intensità seguono i coefficienti dello sviluppo di potenza di un binomio, per i dimeri si ha 1:2:1

CODOMINANTI



Elettroforesi di ISOZIMI e ALLOZIMI

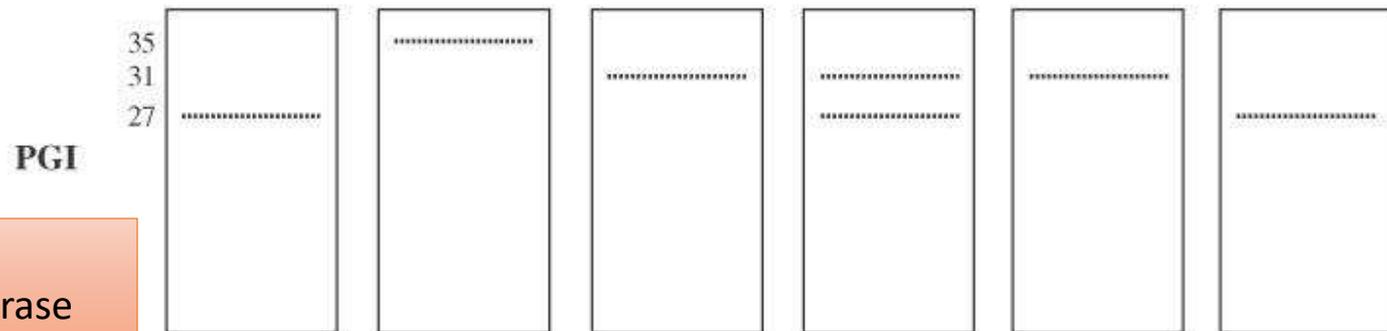
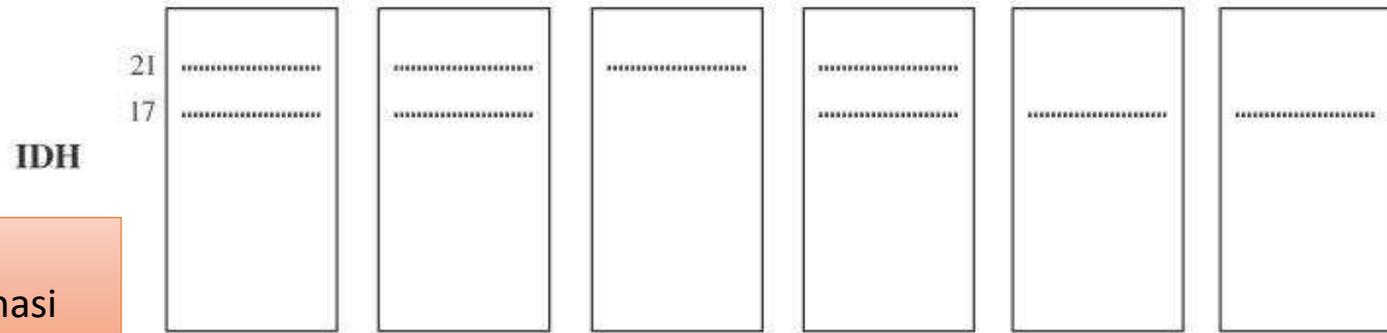
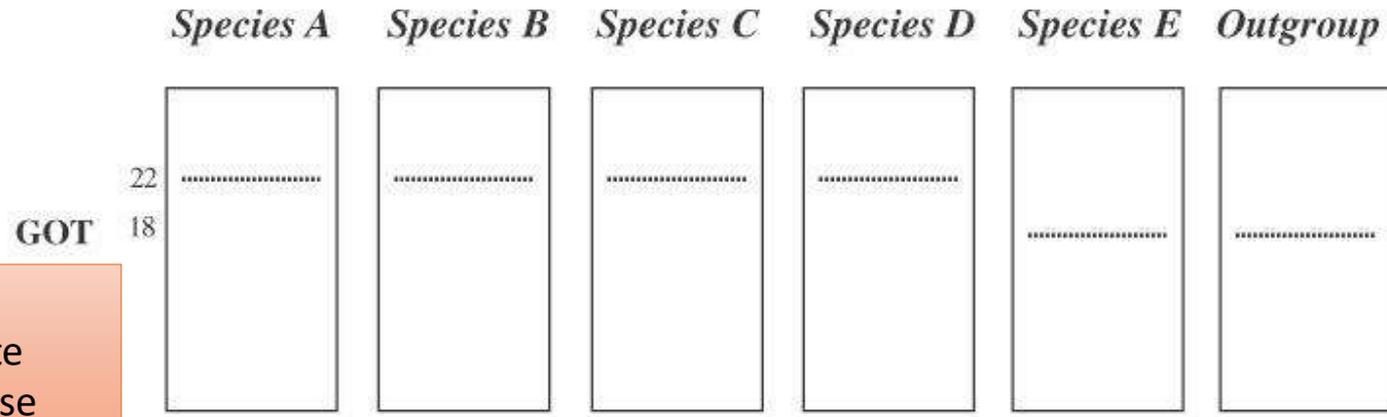


Table 3.1 Characteristics of some of the isoenzymes used for forensic protein profiling in the early 1980s.

Erythrocyte Isoenzyme	Protein Symbol	Number of Alleles	Discrimination Potential
Phosphoglucosmutase	PGM	2 (4 alleles with IEF)	10 phenotypes possible with IEF
Erythrocyte acid phosphatase	ACP/EAP	3	0.67
Esterase D	ESD	2	0.27
Adenylate kinase	AK	2	0.25
Glyoxalase I	GLO	2	0.57
Adenosine deaminase	ADA	2	0.06

Information from Li, R. (2008). Forensic biology, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 169; and Ballantyne, J. (2000). 'Serology,' in Encyclopedia of forensic sciences, San Diego: Academic Press.

Key: IEF: isoelectric focusing.



Marcatori biochimici

Vantaggi:

- ✓ Codominante
- ✓ Facile da usare
- ✓ Basso costo

ISOENZIMI



BASE GENETICA RELATIVAMENTE RISTRETTA



NUMERO DI PROFILI IDENTIFICABILI LIMITATO



Esistenza di specie criptiche (gemelle)

1. Quasi totale identità morfologica
2. Isolamento riproduttivo



(Oncoforo peripatus)



Over 100 local species
compared to the 7 previously
recognized in Australia

TUATARA (*Sphenodon punctatus*)



2 species instead of 1,
New Zealand

Esistenza di ibridi IBRIDI INTERSPECIFICI

1. Individui fertili e in grado di riprodursi, ottenuti dall'incrocio di due "specie".
2. Caratteristiche morfologiche intermedia
3. Frequenti sia nelle piante che negli animali.
4. Frequenti in natura (**ibridazione naturale**)
5. Incremento esponenziale in allevamento grazie alle migliori performance (**ibridazione artificiale**)





La **LIGRE** è un ibrido nato da un leone e una tigre femmina. I leoni e le tigri in natura non condividono lo stesso territorio, pertanto le possibilità di accoppiarsi fra loro sono quasi nulle.

Questo incrocio, così come quello a genitori invertiti (tigone), è documentato solo in cattività.

Esistenza di CONVERGENZA EVOLUTIVA

- ✓ Stesse caratteristiche fenotipiche evolute **INDIPENDENTEMENTE** in organismi filogeneticamente distanti.
- ✓ Effetto della SELEZIONE NATURALE su caratteri favorevoli in specie che condividono stesso habitat o nicchia ecologica
- ✓ Confusione nella collocazione filogenetica della specie.



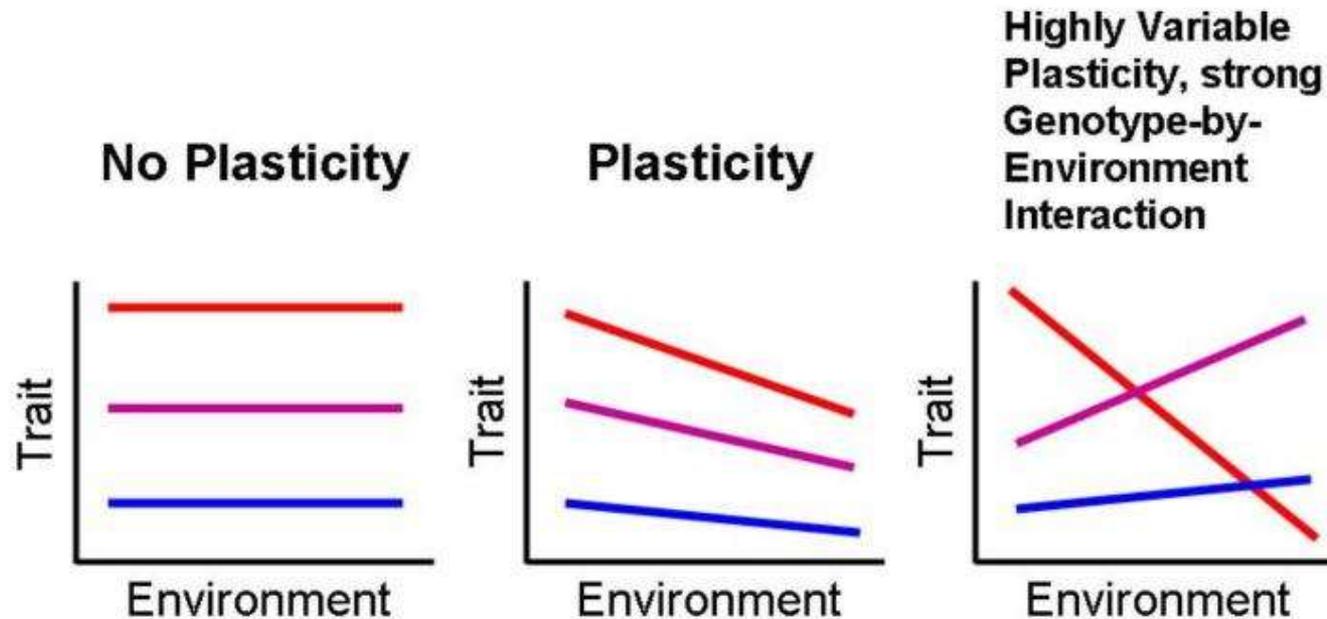
Cactacea



Euphorbiacea

ESISTENZA DI UNA CONSIDEREVOLE PLASTICITA' MORFOLOGICA

The ability of one **genotype** to produce more than one phenotype when exposed to different environments.



Interazione genotipo-ambiente

Allele responsabile tipo *himalaian* produce pelliccia scura in corrispondenza delle estremità corporee. Allele temperatura-sensibile



Allevato a 20 °C
o a temperature inferiori



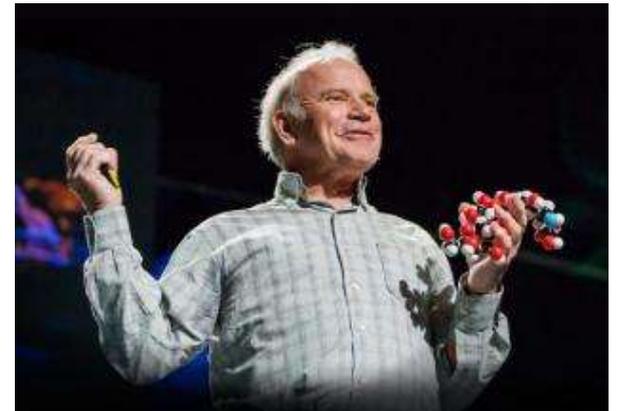
Allevato a temperature
superiori a 30 °C

1953: Scoperta della struttura molecolare del DNA (Watson e Crick)

ECCOMI QUA,
SONO IL DNA!



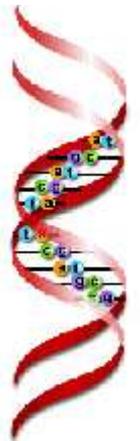
1983: Scoperta della Reazione a catena della Polimerasi (PCR) (Mullis)



1985 – Utilizzo forense del DNA

DNA revolution

- **STABILE** (mummie, alimenti, ecc. . . .)
 - Purificazione DNA anche da materiale danneggiato/antico
- **UNIVERSALE** = in tutti i tessuti, fluidi biologici →
Purificazione DNA da ogni tipo di residuo/traccia
- **+ INFORMATIVO** (rispetto alle proteine)
 - Codice degenerato
 - Presenza di lunghe porzioni NON codificanti
(tasso di mutazione + elevato)



“L’Identificazione Molecolare”

Diversità INDIVIDUALE



Differenze tra individui

Diversità DI POPOLAZIONE



Differenze tra popolazioni

Diversità DI SPECIE



Differenze in n° e abbondanza di specie

Diversità DI ECOSISTEMI



Differenze nella struttura di relazioni tra specie, in località diverse (habitat) con le specifiche differenze ambientali

DNA revolution

Come identificare e misurare queste differenze?

- ✓ Caratterizzare le varianti alleliche a diversi **LOCI**
- ✓ Caratterizzazione di **MARCATORI MOLECOLARI**

Marcatore (genetico) Molecolare

Definiamo **marcatore (genetico) molecolare** qualsiasi carattere **polimorfico mendeliano** che può essere impiegato per seguire l'ereditarietà di un segmento cromosomico attraverso un albero genealogico.

Marcatore genetico ideale...



Marcatore genetico ideale

1. Non influenzato dall'ambiente
2. Neutrale
3. Stabile
4. Facile da monitorare
5. Numeroso
6. Codominante
7. Polimorfico
8. Presente in qualsiasi tessuto
9. Indipendente da sesso ed età
10. Analisi automatizzabile



ESISTE ?

Marcatore genetico ideale

1. Non influenzato dall'ambiente
2. Neutrale
3. Stabile
- 4. Facile da monitorare**
5. Numeroso
6. Codominante
7. Polimorfico
8. Presente in qualsiasi tessuto
9. Indipendente da sesso ed età
10. Analisi automatizzabile



MARCATORE GENETICO IDEALE: FACILITA' DI PRELIEVO, BASSO COSTO



© 1997 Randy Glasbergen.
E-mail: randy@glasbergen.com



“You don’t look anything like the long haired, skinny kid I married 25 years ago. I need a DNA sample to make sure it’s still you.”

Marcatore genetico ideale

1. Non influenzato dall'ambiente
2. Neutrale
3. Stabile
4. Facile da monitorare
5. Numeroso
6. Codominante
- 7. Polimorfico**
8. Presente in qualsiasi tessuto
9. Indipendente da sesso ed età
10. Analisi automatizzabile



IL POLIMORFISMO

È una **variazione in una sequenza del DNA (locus genico)** presente in una popolazione con una frequenza maggiore dell'1%.

Marcatore genetico ideale

1. Non influenzato dall'ambiente
2. Neutrale
3. Stabile
4. Facile da monitorare
5. Numeroso
- 6. Codominante**
7. Polimorfico
8. Presente in qualsiasi tessuto
9. Indipendente da sesso ed età
10. Analisi automatizzabile



Classificazione dei marcatori genetici

In base al tipo di informazioni fornite

1) A seconda del genoma su cui mappano:

Mitocondriale – plastidiale –nucleare:

2) Forniscono informazioni su uno o più loci rispettivamente:

singolo locus o multilocus:

3) codominante – dominante

d) Se il polimorfismo osservato è il risultato dell'evoluzione neutrale o è dovuto a processi selettivi: neutrale o adattivo

Marcatore genetico ideale: codominante

- DOMINANZA
 - DOMINANZA INCOMPLETA
 - CODOMINANZA
- Il fenotipo dell'eterozigote è uguale a quello di uno degli omozigoti
 - Il fenotipo dell'eterozigote è intermedio, cioè **rientra nell'intervallo** definito dai due omozigoti
 - Il fenotipo dell'eterozigote include quello di entrambi gli omozigoti

Classificazione dei marcatori genetici

In base al tipo di informazioni fornite

1) A seconda del genoma su cui mappano:

Mitocondriale – plastidiale –nucleare:

2) Forniscono informazioni su uno o più loci rispettivamente:

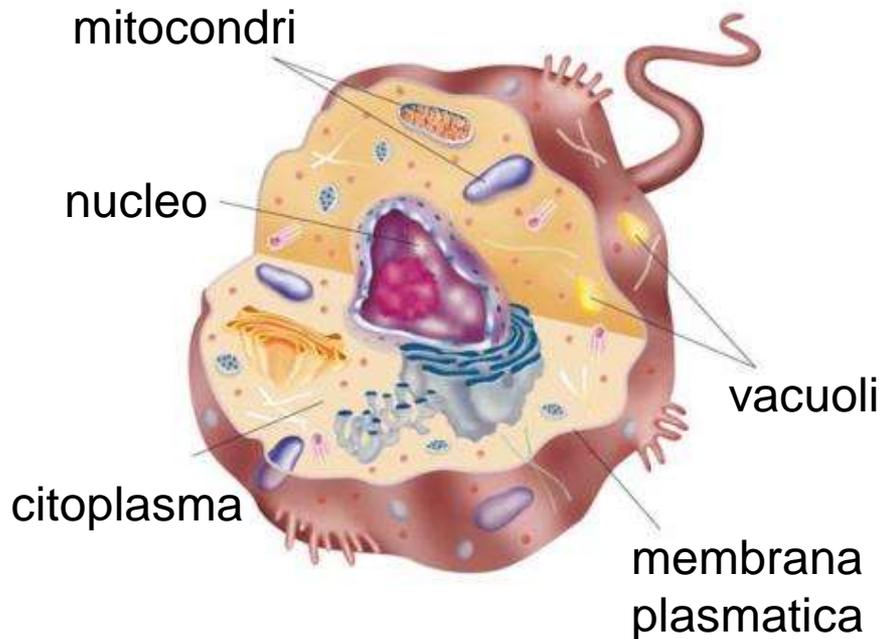
singolo locus o multilocus:

3) codominante – dominante

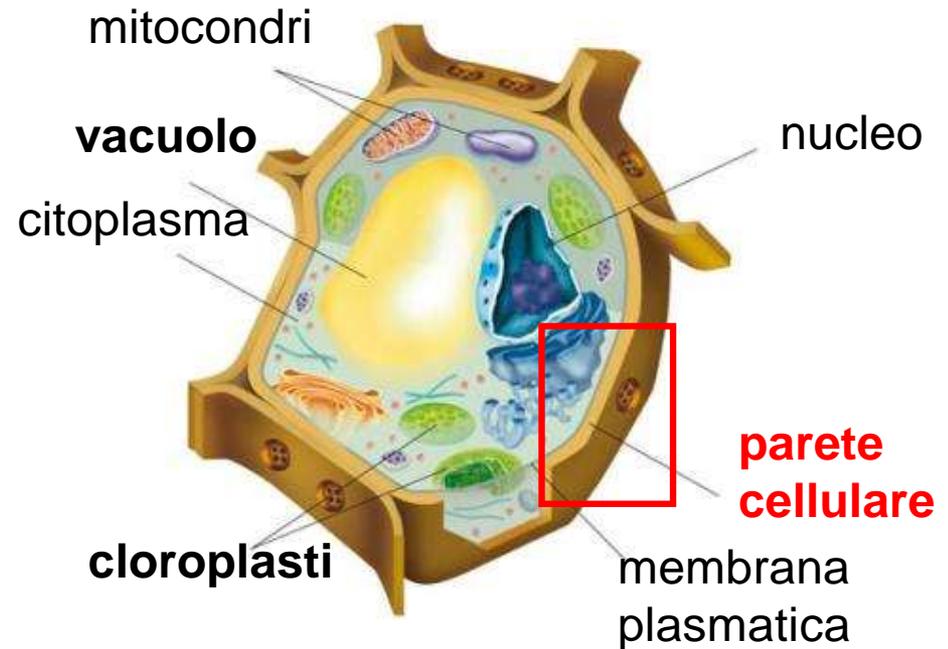
d) Se il polimorfismo osservato è il risultato dell'evoluzione neutrale o è dovuto a processi selettivi: **neutrale** o **adattivo**

Marcatori: Mitochondriale – plastidiale – nucleare

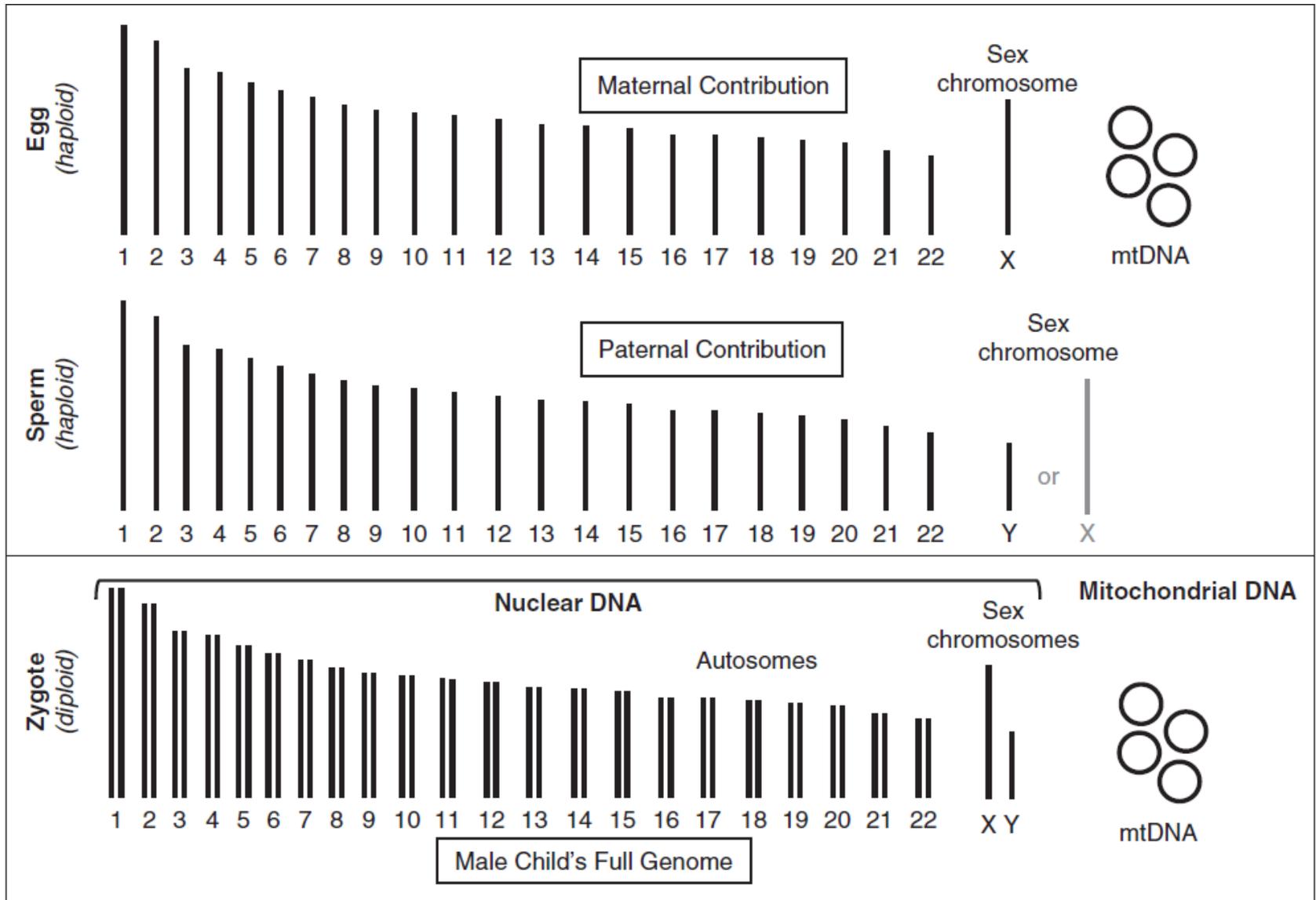
CELLULA ANIMALE



CELLULA VEGETALE



Classificazione dei marcatori genetici



Classificazione dei marcatori genetici : (2)

In base al loro nome (caratteristiche del locus)

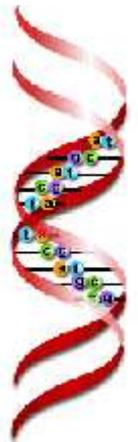
Es. **microsatellite (VNTR), minisatellite (STR), SNPs, ...)**



Classificazione dei marcatori genetici : (3)

In base al loro modo di evidenziarli (procedure sperimentali)

Es: RFLP, RAPD



Scoperta dei primi polimorfismi genetici, i gruppi sanguigni AB0, da parte di Landsteiner

Scoperta ed uso dei polimorfismi degli enzimi dei globuli rossi

Ammissione del DNA nelle corti italiane (caso Balzorano)

Fondazione del UK DNA Database (profili STR)

Locard enuncia il principio secondo il quale "ogni contatto Lascia una traccia"

Ammissione del DNA nelle corti

Sviluppo dei primi kit commerciali per il profilo di STRs

EPOCA DEGLI SNPs

1900

1920

1984

1987

1989

1992

1995

2000

2004

1915

1960

1986

1988

1991

1993

1997

(1920s-1950s)
Scoperta ed uso di altri gruppi sanguigni e proteine del siero

Introduzione della PCR in genetica forense

Primo utilizzo del DNA in criminalistica

Primo utilizzo del DNA per l'identificazione di vittime in disastri di massa (Waco, Texas)

Primi test, basati sugli anticorpi, per i gruppi sanguigni AB0

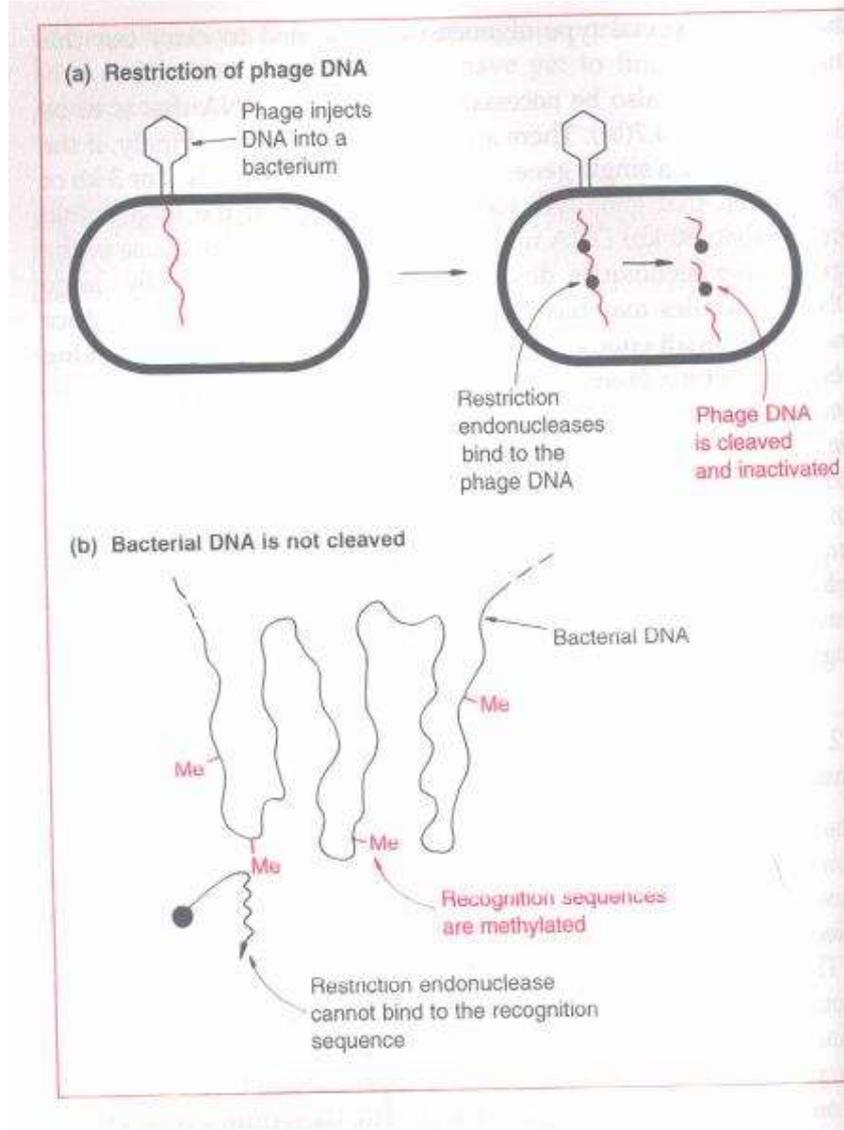
Sviluppo del multilocus DNA fingerprinting da parte di Jeffreys, seguita dal single-locus-profiling (SLP)

Caratterizzazione dei primi STRs umani polimorfi

Analisi di profili da singole cellule (singolo capello)

La scoperta degli enzimi di restrizione (~1950)

alcuni batteri erano immuni a infezioni da batteriofagi (host-controlled restriction)



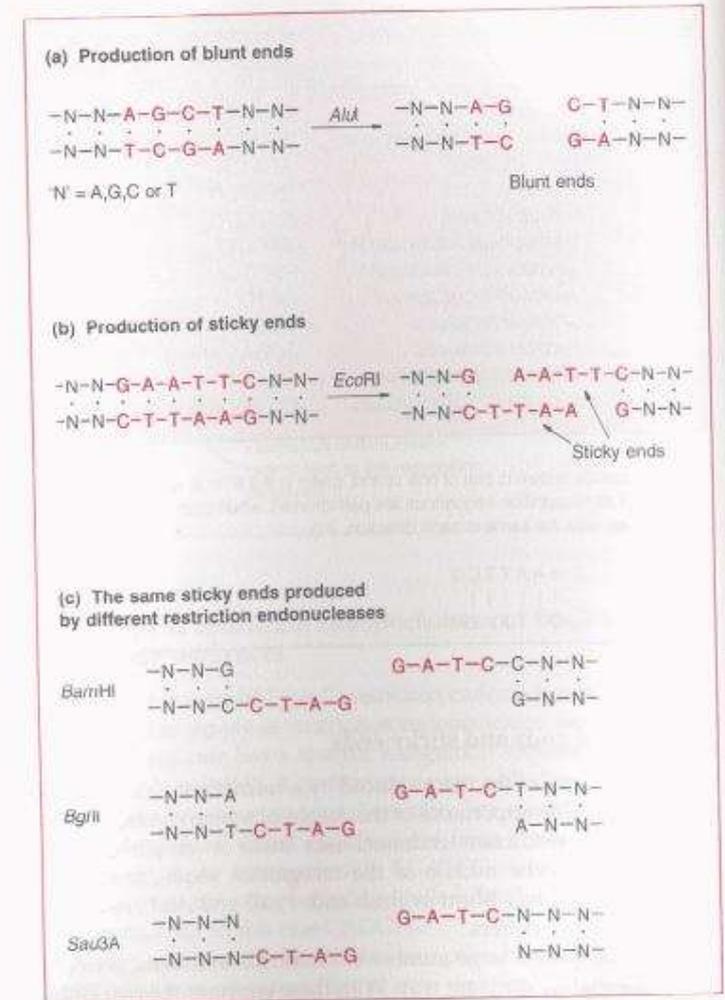
- Presenti in tutti i batteri
- Più di 1200 sono stati caratterizzati
- Classificati in tre classi: tipo I, tipo II e tipo III (questi ultimi hanno un funzionamento complicato)
- **Tipo II sono usati come enzimi di restrizione per il cloning dei geni**

Le sequenze di riconoscimento per alcuni frequenti enzimi di restrizione

Table 4.1 The recognition sequences for some of the most frequently used restriction endonucleases

Enzyme	Organism	Recognition sequence ^a	Blunt or sticky end
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	sticky
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	sticky
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	sticky
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	sticky
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	blunt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	AAGCTT	sticky
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _f	GANTC	sticky
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	sticky
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	blunt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	sticky
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	blunt
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	sticky

^a The sequence shown is that of one strand, given in the 5' to 3' direction. Note that almost all recognition sequences are palindromes: when both strands are considered they read the same in each direction, e.g.



http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html



REBASE[®]

The Restriction Enzyme Database

rebase.neb.com

Use this tool as a guide to the ever-changing landscape of restriction enzymes.
REBASE is a dynamic, curated database of restriction enzymes and related proteins.

RESOURCES ?

Data files
Sequence data
PacBio data
Crystal Data
Methylation Sensitivity

Lists and compilations
Tools
Enzymes
Genomes
Suppliers

Publications
Related websites
FTP



WHAT'S NEW?



SUBMIT DATA



SUBSCRIBE



CONTACT US

SEARCH ?

use quotes around phrases

by

[Advanced Search](#)

Search

Clear



ABOUT REBASE



CITING REBASE



HELP

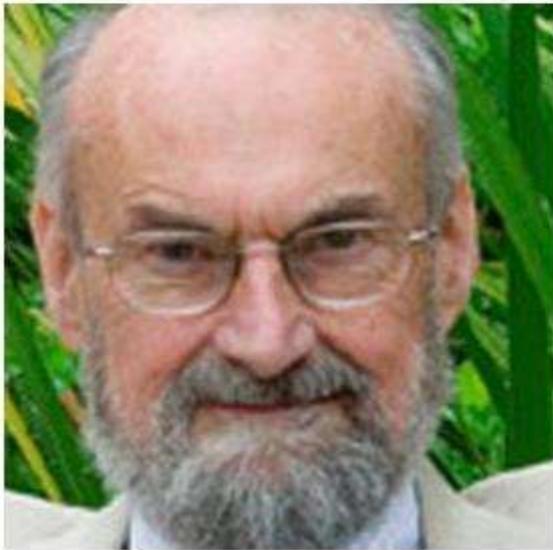


Classic



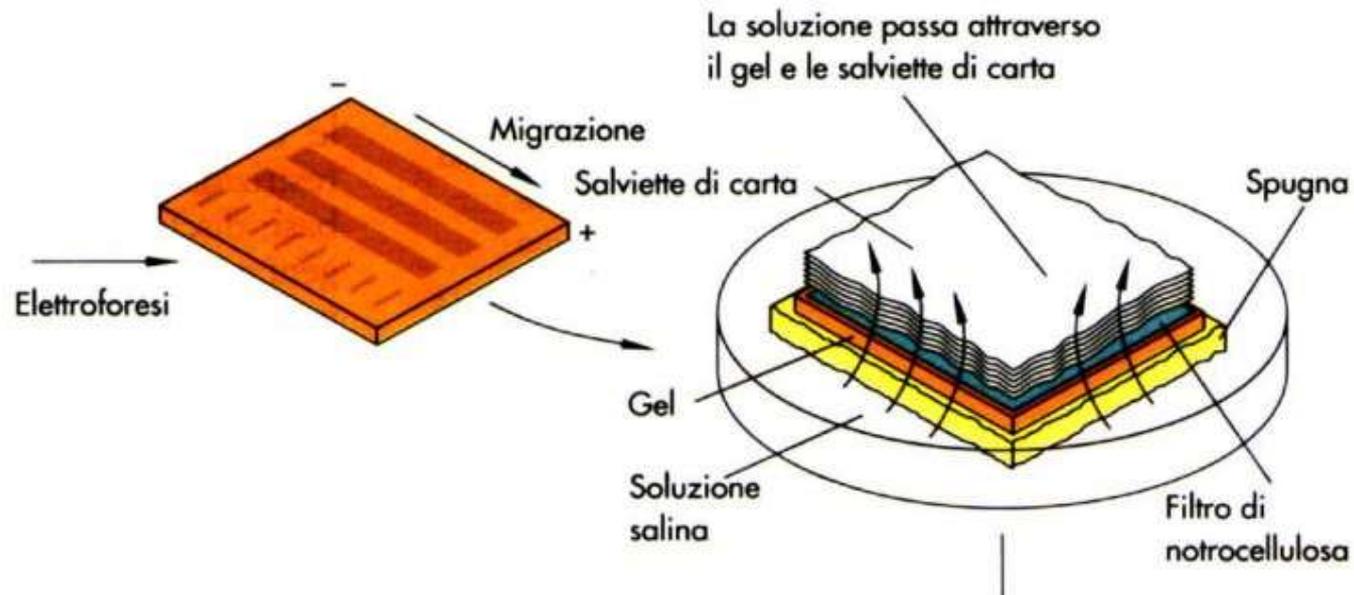
Trasferimento di acidi nucleici (anni '70 Southern Blotting)

Edwin Southern

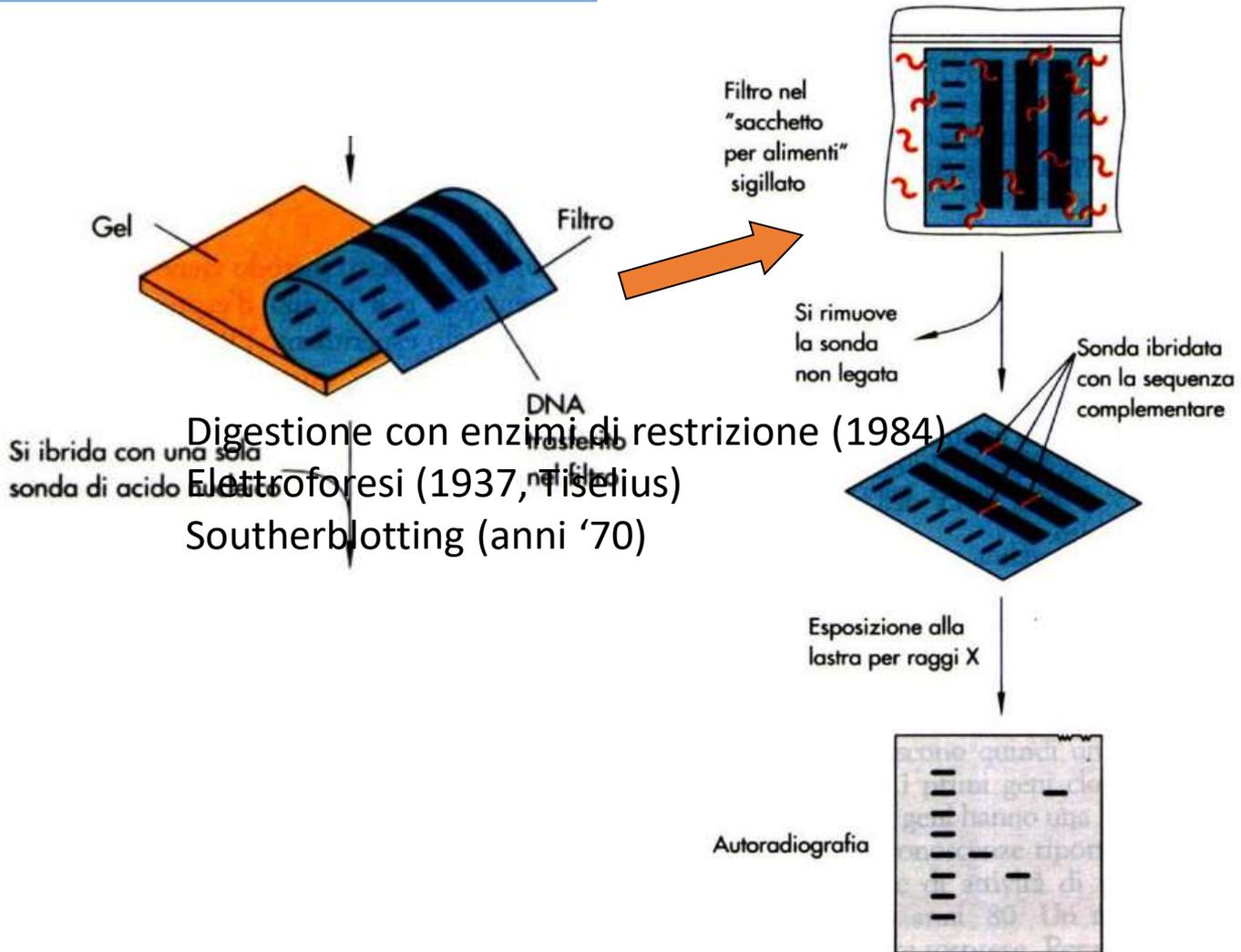


Biologo molecolare britannico
Prof. di Biochimica (Università di Oxford).

Schema trasferimento



Schema ibridazione



Estrazione del DNA

Elettroforesi (1937, Tiselius)

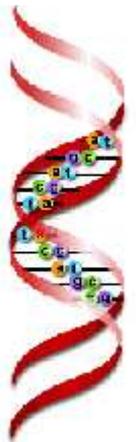
Digestione con enzimi di restrizione (1950) (RFLP)

Southernblotting (anni '70)

Classificazione dei marcatori genetici : (3)

In base al loro modo di evidenziarli (procedure sperimentali)

Es: RFLP, RAPD



Early 1980s: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

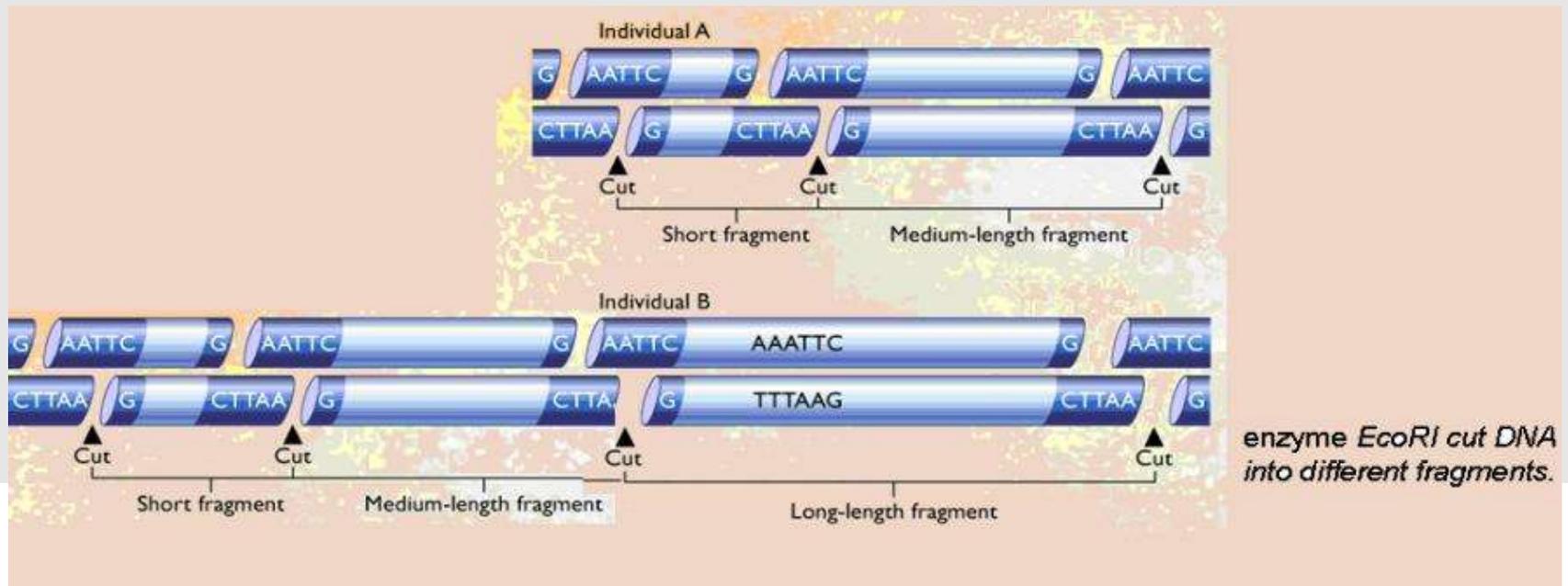
DNA Analysis Technique: **RFLP**

- It was the first commercial technique of DNA analysis.
- It can be used in paternity cases or criminal cases to determine the source of a DNA sample.

RFLP

Steps

1. Viene utilizzato un enzima di restrizione per tagliare il DNA.
2. I frammenti del DNA di diversa lunghezza vengono prodotti



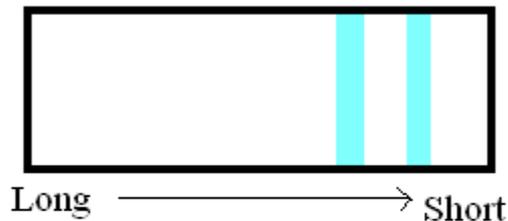
Early 1980s: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

- **How to separate DNA fragments?**

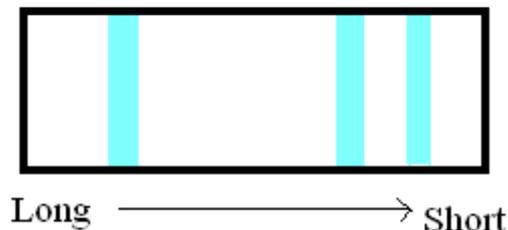
RFLP

3. Utilizzando l'elettroforesi su gel, i frammenti vengono separate, così i frammenti di \neq lunghezza possono essere separati. Ciò produce un pattern di bande.

Individual A

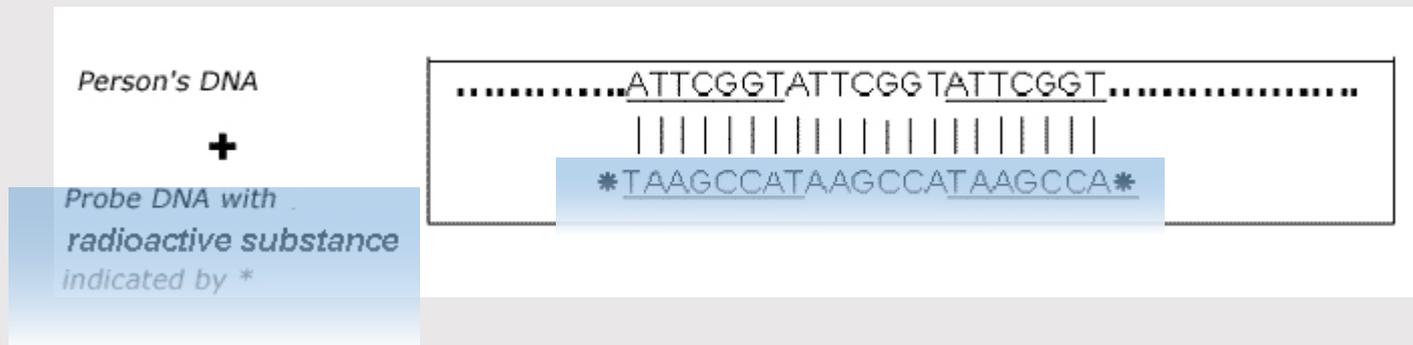


Individual B



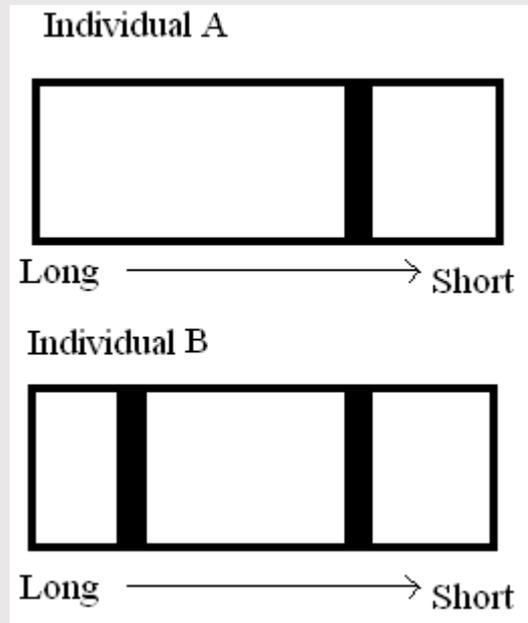
RFLP

4. Cover specific radioactive probes over the gel. The probes contain a match for the DNA sequence that the test is looking for.



RFLP

5. Put a film under the gel to record. Allow signal exposure in dark room.



6. *DNA fingerprints* are now ready for analysis and comparison.

RFLPs: MARCATORI CODOMINANTI

Alec Jeffreys

genetista Università di Leicester, UK



The Telegraph, 8-05-2009

1984

realizza che le variazioni del codice genetico (VNTR) possono essere usate per identificare gli individui.

Forensic application of DNA 'fingerprints'

Peter Gill*, Alec J. Jeffreys† & David J. Werrett*

* Central Research Establishment, Home Office Forensic Science Service, Aldermaston, Reading, Berkshire RG7 4PN, UK

† Department of Genetics, University of Leicester, University Road, Leicester LE1 7RH, UK

Nature, 1985

Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints

Alec J. Jeffreys, John F. Y. Brookfield & Robert Semeonoff

Department of Genetics, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK

Nature, 1985

Minisatellite repeat (VNTR) – Jeffreys Probes

Probe
CTCCGCC

GAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCC

2 repeats

GAGGCGGGAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCCCTCCGCC

3 repeats

GAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCC

4 repeats

GAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGGGAGGCGG
CTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCCCTCCGCC

6 repeats

+/- di VNTR testate con il legame di oligonucleotide complementari (probe) a una sequenza ripetuta (core)

DNA STRUCTURE AND THE GENOME

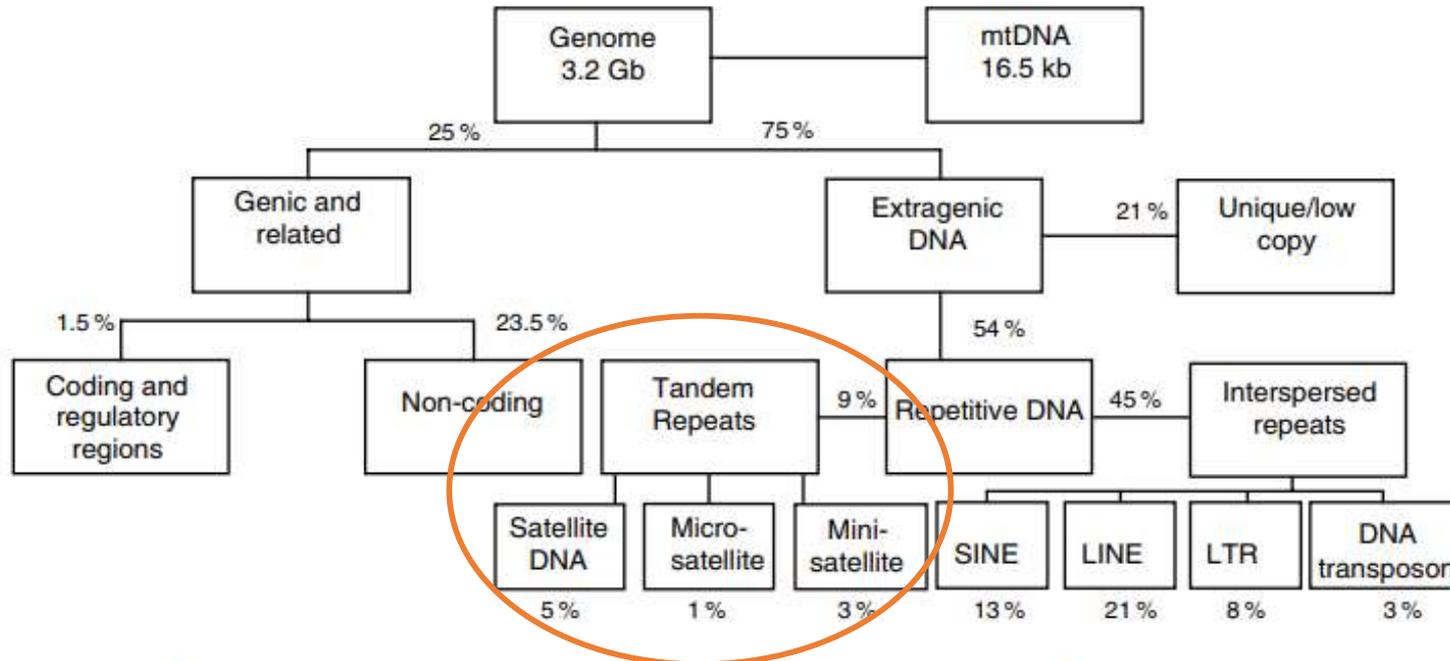


Figure 2.4 The human genome can be classified into different types of DNA based on its structure and function. Modified with permission from Jasinska, A., and Krzyzosiak, W.J. (2004) Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Letters* 567, 136–141).

Classificazione del DNA satellite

**Tipo di
ripetizione**

**Livello di
ripetizione per
locus**

N di loci

**Lunghezza
dell'unità ripetuta
(bp)**

Satellite

10^3-10^7

1 o 2/ crom.

1000 - 3000

Minisatellite

$10-10^3$

**Migliaia per
genoma**

9 - 100

(VNTR)

Microsatellite

$10-10^2$

**Fino a 10^5
per genoma**

1 - 6

(STR)

DNA ripetuto in tandem o DNA satellite

Tipico dei genomi eucariotici (raro nei procarioti)

Satellite

Unità da 5 a 200 bp
 Segmenti lunghi fino a qualche centinaio di Kb
 localizzato principalmente nei centromeri
 (es. DNA alfoide umano)

Minisatelliti

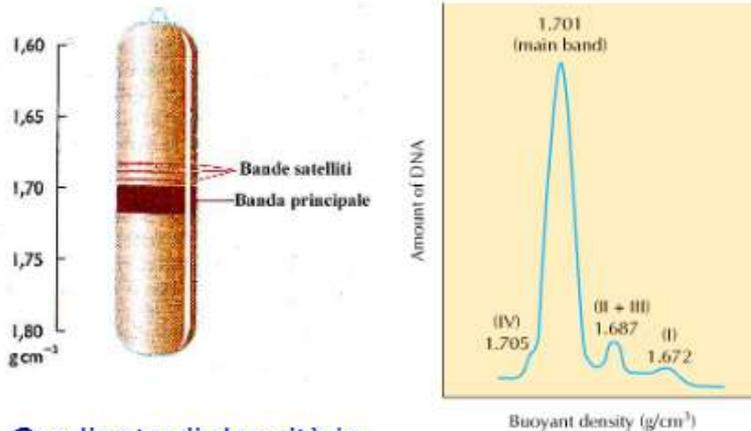
Unità lunghe fino a 25 bp
 Segmenti lunghi fino a 25 kb
 (es. DNA telomerico; minisat. Telomerici)
 DNA minis. ipervariabile -> DNA fingerprint

Microsatelliti

Unità < 4bp
 Segmenti lunghi fino 150 bp

5'-CACACACACACA-3'

Es.: nell'uomo la ripetizione CA
 copre lo 0,25% del genoma



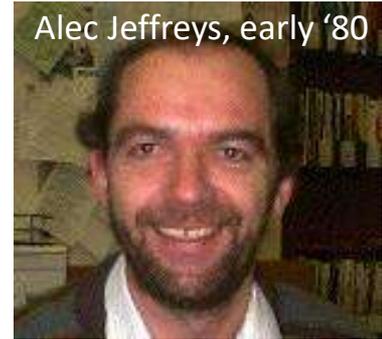
Gradiente di densità in

50-60 ore a 100.000 g

Densità di

Assorbanza a 260 nm (C+G)

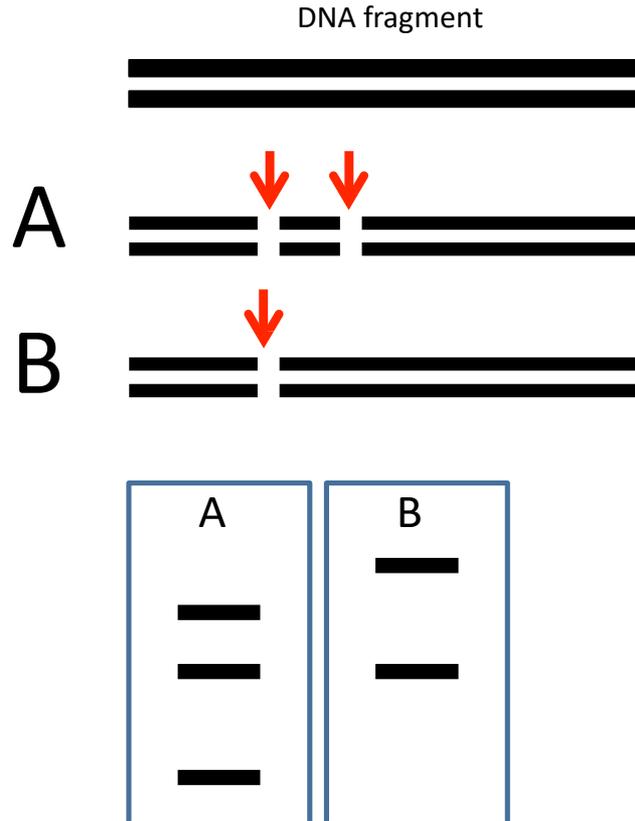
RFLP-Restriction Fragment Polymorphisms



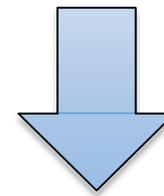
Principio base:

Digestione del DNA con **ENZIMI DI RESTRIZIONE**

I frammenti risultanti sono visualizzati mediante corsa elettroforetica



- Presenza (+)/assenza (-)
- di uno o più siti di restrizione



Differenze tra pattern
di bande

RFLP

1° evidenza dell'utilità degli RFLP nei casi penali

1. 1983 e 1985: rapimento, violenza sessuale e uccisione di 2 giovani donne a Narborough, Inghilterra.
2. **Stesso modus operandi + sangue gruppo A (da liquido seminale).**
3. 1986: Richard Buckland incriminato per entrambi i delitti, ma **SCAGIONATO** dall'analisi del DNA fingerprinting.
4. **Indagine genetica su 5000 uomini locali con gruppo A** (mediante richiesta di prelievo di sangue o saliva) → **NESSUNA CORRISPONDENZA.**
 1. 1987: si viene a sapere che Colin Pitchfork aveva chiesto ad un amico di partecipare allo sceneing in sua vece.
 2. **Il suo profilo genetico era identico a quello del DNA raccolto sulle scene del crimine.**

Consenso al prelievo: **Disponibilità di campioni freschi e ben conservati**

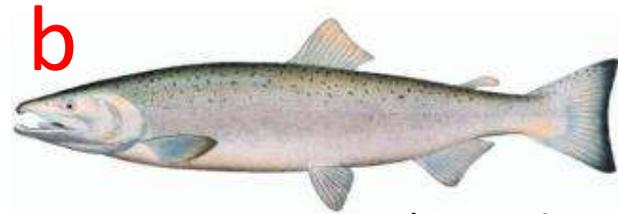


RFLP

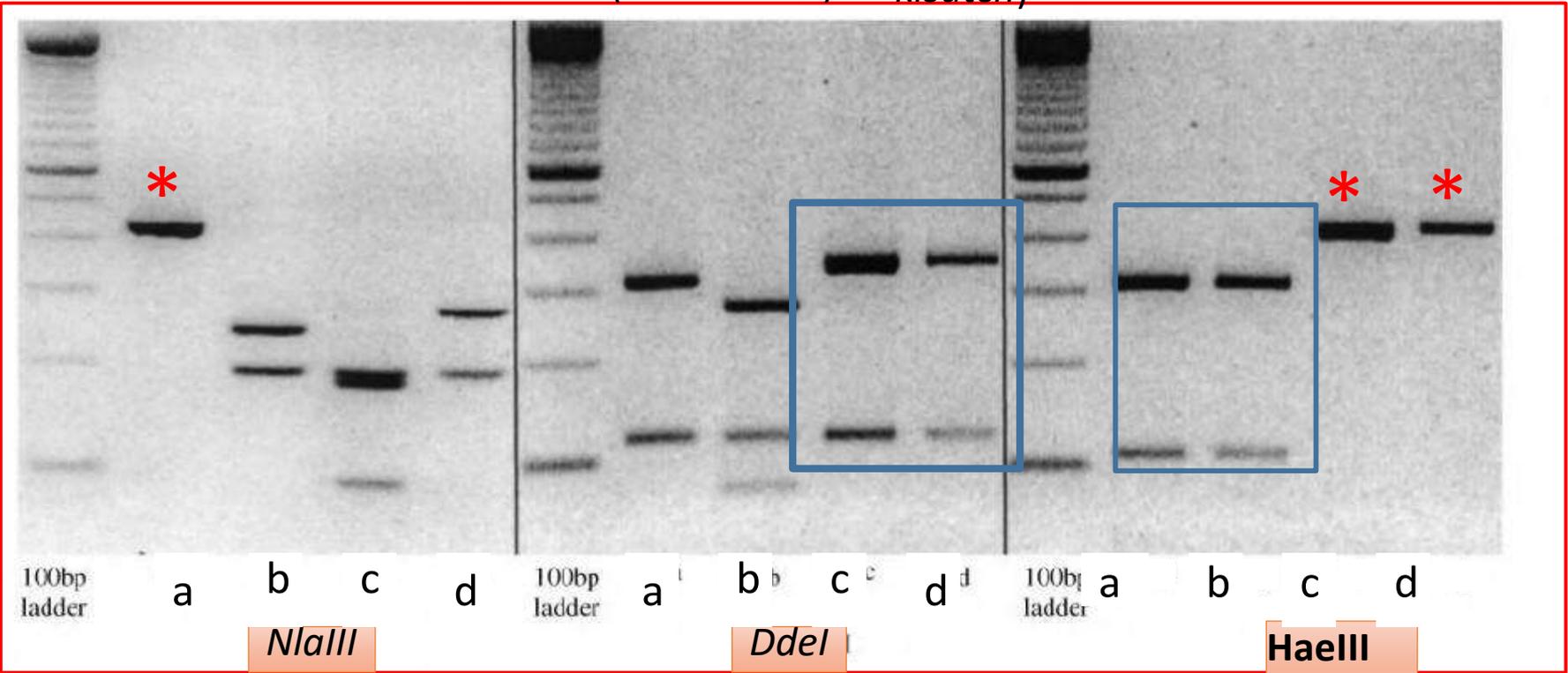
mtCyt b



Salmon atlantico (*Salmo salar*)



Salmon argentato (*Oncorhynchus kisutch*)



Salmon rosa (*O. gorbuscha*)



Salmon keta (*Oncorhynchus keta*)

SVANTAGGI:

- Richiede DNA di buona qualità
Costoso se si utilizzano tanti enzimi
- **Poco informativo** nel caso di mutazioni all'interno di una stessa specie



Vantaggi:

1. **Codominante**
2. **Eredità mendeliana**
3. **Riproducibile**



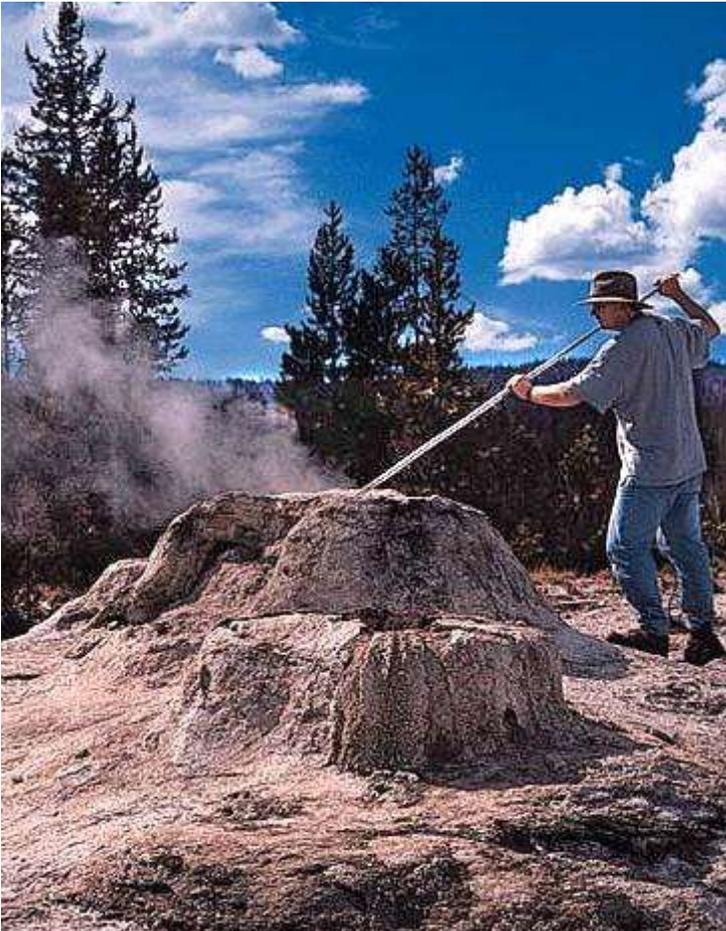
Digestione con enzimi di restrizione (1950)

Elettroforesi (1937, Tiselius)

Southerblotting (anni '70)

PCR (1983)

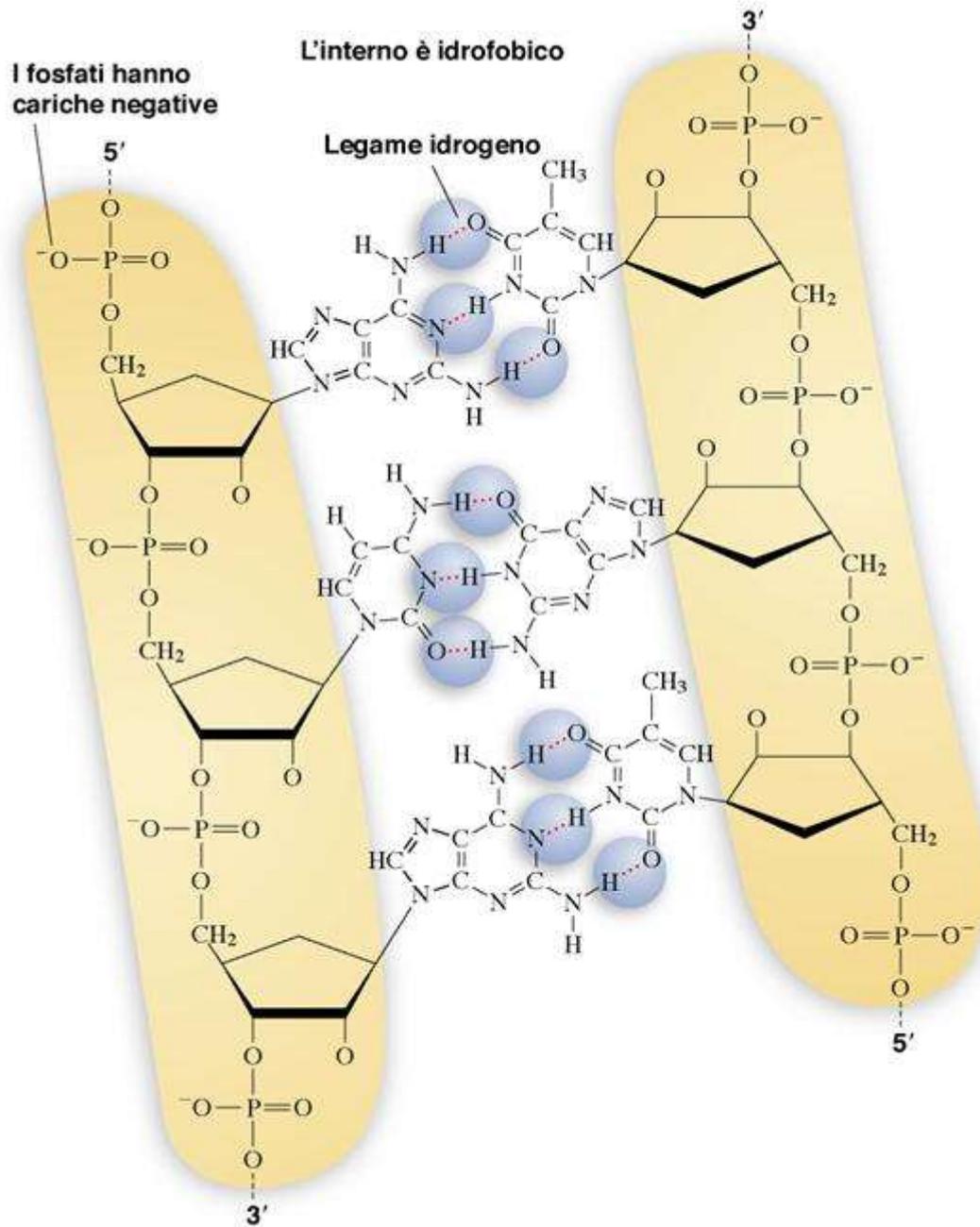
Thermostable DNA Polymerase: Yellowstone National Park



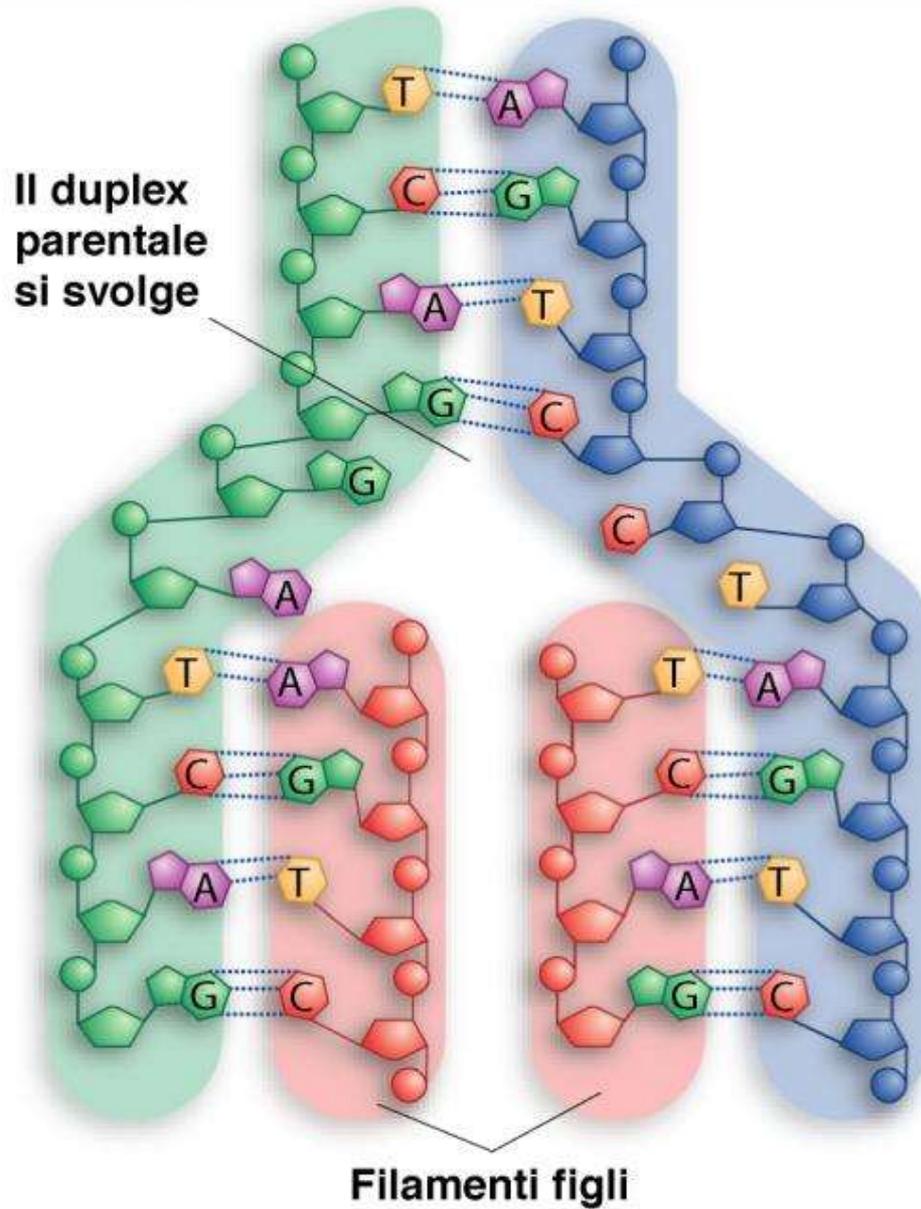
1969 Thomas Brock isola un nuovo batterio dalle sorgenti calde dello Yellowstone National Park.

1976 viene isolata la DNA polimerasi di *T. aquaticus* (Taq) in grado di mantenere la sua attività oltre i 75°C.





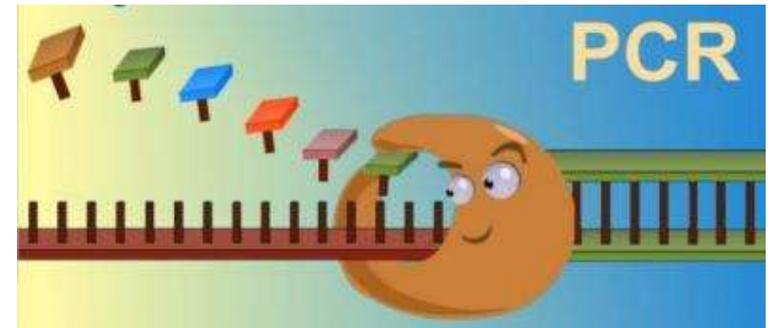
L'appaiamento delle basi spiega la specificità della replicazione



Reazione a catena della polimerasi (PCR)

DNA polimerasi termostabile di *Thermus aquaticus* (Taq polimerasi)

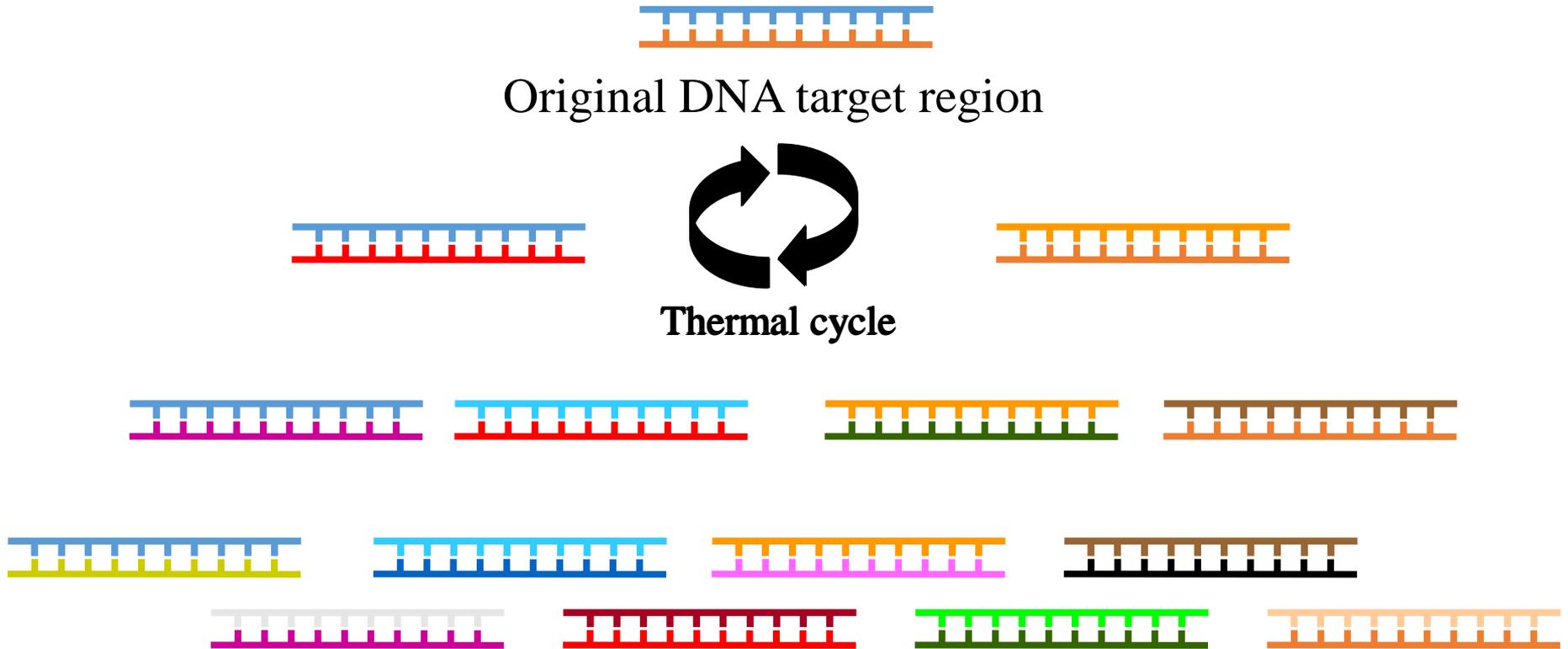
Permette di lavorare a temperature elevate senza denaturarsi



No attività 3'-5' esonucleasica (proofreading)

Tasso di errore $1 \times 10^{-4} < X < 1 \times 10^{-5}$

DNA Amplification with PCR (1 Locus)



Componenti e fasi della reazione

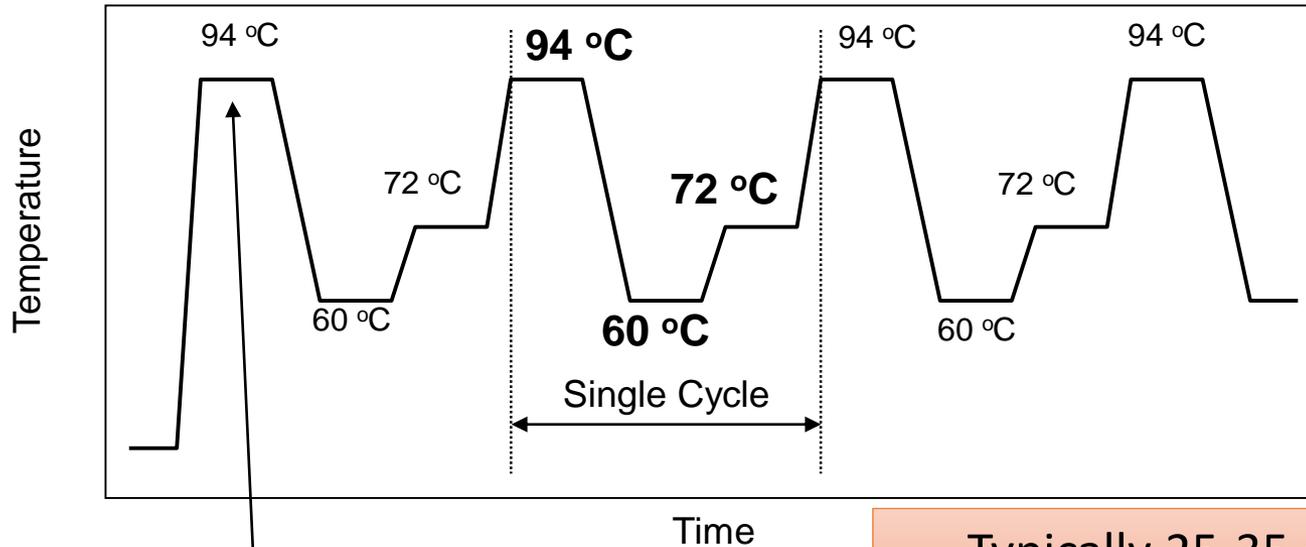
Miscela di reazione: 10-100 μ l

- 1) Tampone
- 2) dNTPs
- 3) Primers
- 4) Templato (DNA a doppio filamento)
- 5) DNA polimerasi termostabile

Fasi della reazione

- 1) Denaturazione : i 2 filamenti della molecola di DNA vengono separati portando la miscela a 94°C per 15"-30".
- 2) Ibridizzazione: la miscela viene raffreddata a $T \cong T_m - 2/3^{\circ}\text{C}$, per 30"-60", perché ciascun primer si appaia con un filamento di DNA.
- 3) Estensione: la soluzione viene riscaldata a 72°C , temperatura ottimale per l'attività della Taq polimerasi.

Thermal Cycling Temperatures

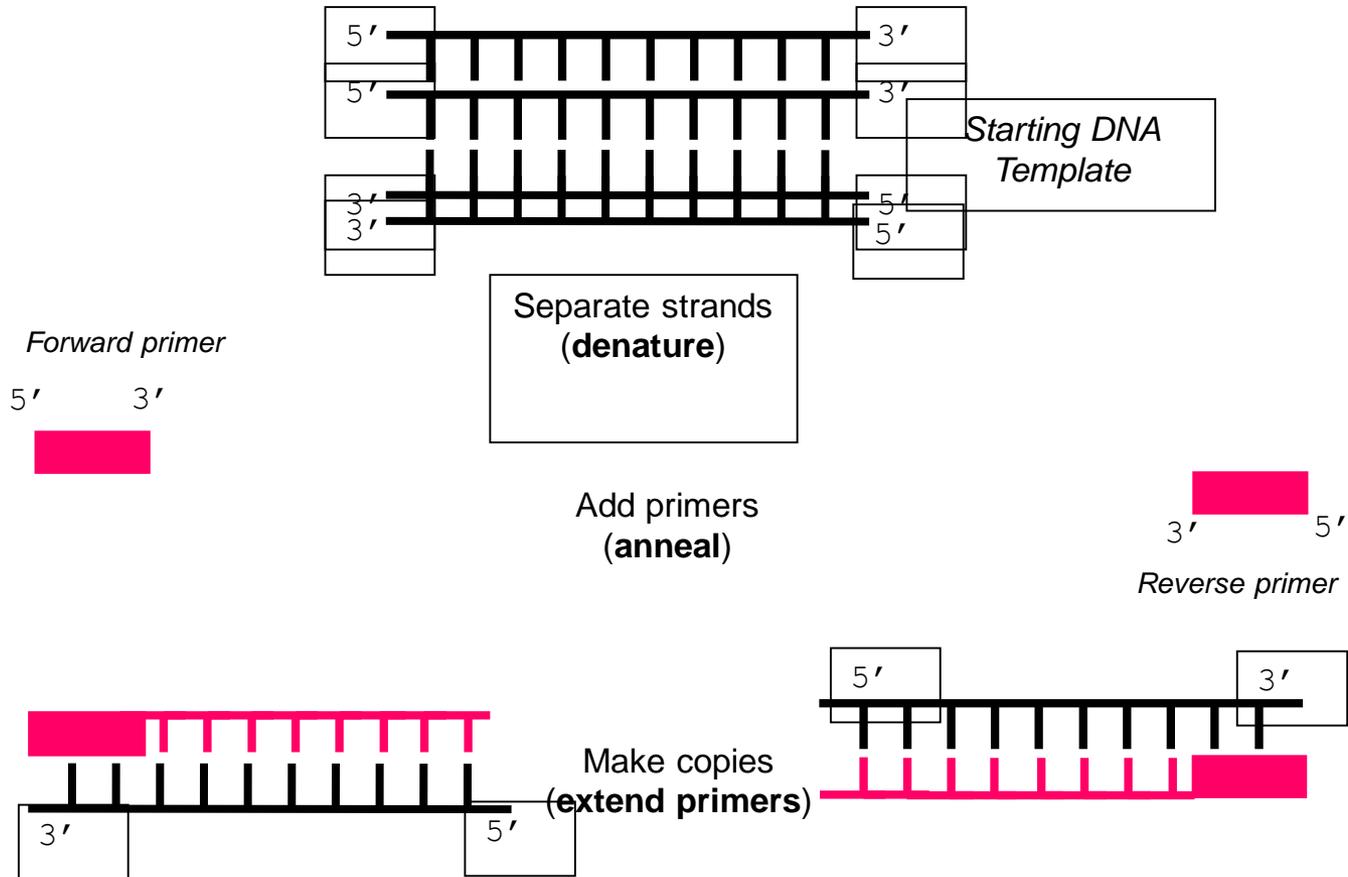


The denaturation time in the first cycle is lengthened to ~10 min. when using a “hot-start” PCR

Typically 25-35 cycles performed during PCR



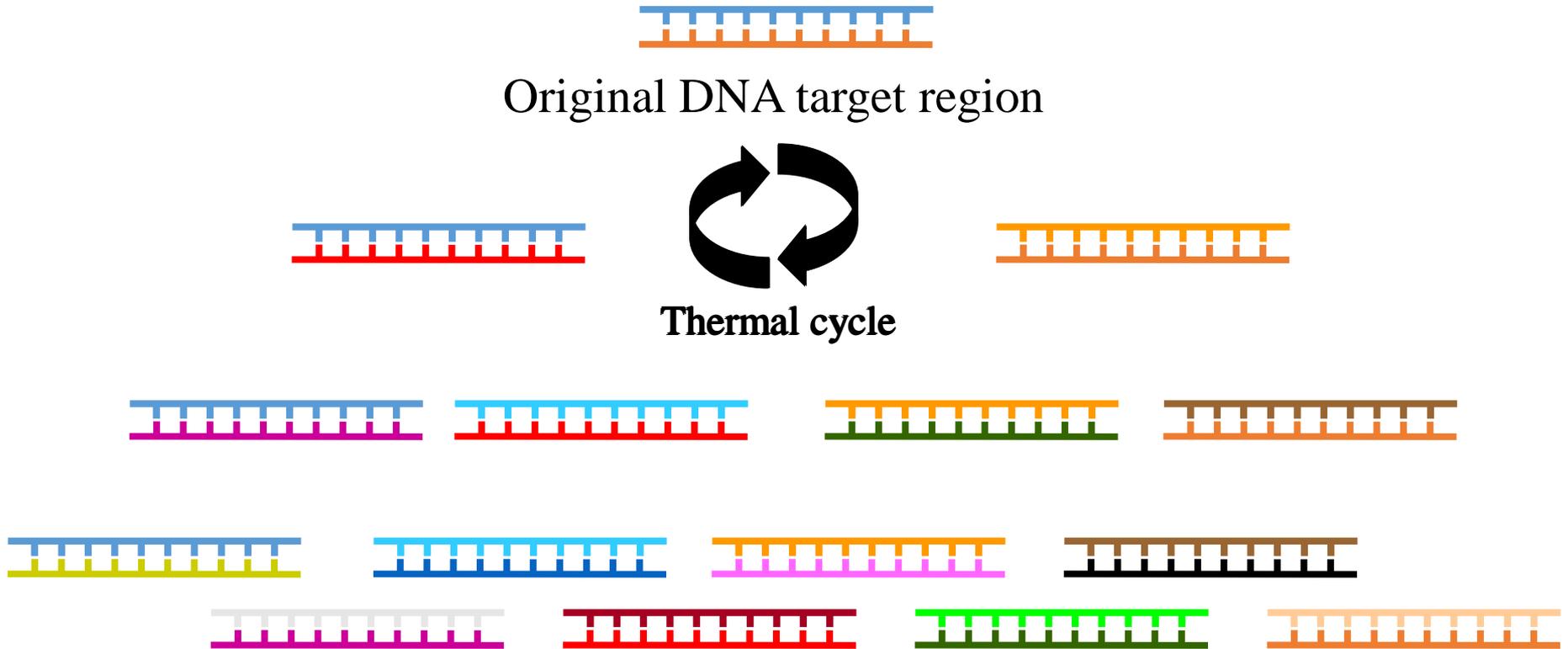
DNA Amplification with PCR (singolo Locus)



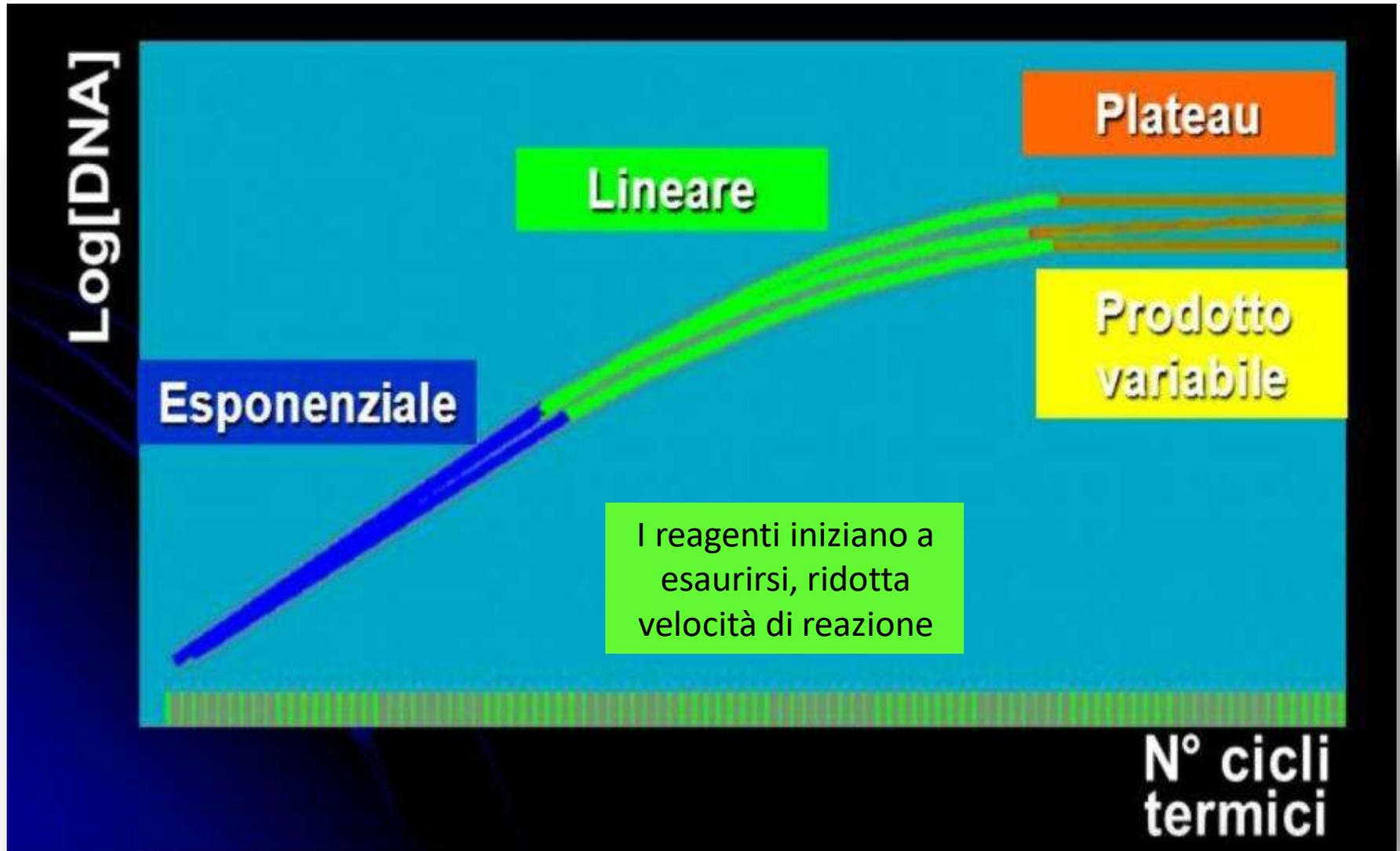
Schema di una reazione PCR

- ◆ Utilizzando 2 primers che si appaiano a filamenti complementari di DNA, vengono sintetizzati 2 nuovi filamenti.
- ◆ Quando il processo viene ripetuto: il templatato iniziale e i nuovi filamenti serviranno come templatati, portando ad un aumento esponenziale di prodotto che termina con le posizioni definite dai primers.
- ◆ Il DNA di partenza, formerà alla fine dei cicli di PCR una piccola frazione del prodotto amplificato.

DNA Amplification with PCR (1 Locus)



Reazione a catena della polimerasi (PCR)



Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ Replicazione esponenziale di una regione di DNA

$$N = N_0 \times 2^n$$

Numero di
ampliconi

Numero iniziale di
molecole di DNA

Numero di cicli
della reazione di
PCR

Primer Design

- <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3 www.cgi>
- <http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/primique/front.py>
- Avoid inter-strand homologies and intra-strand homologies
- T_m of forward primer = T_m of reverse primer
- G/C content of 20–80%
- avoid longer than GGGG
- Product size (100–700 bp)
- Target specificity



Come calcolare T_m ?

Sperimentalmente (corti oligomeri: 14–20 bp) può essere determinata, ma di solito si utilizza la seguente formula:

$$T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T]) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Quindi la temperatura di annealing per la PCR è calcolata 1-2°C sotto il T_m .

IMPORTANTE: I due primers devono essere disegnati in modo da avere la stessa T_m

Quanto lunghi devono essere i primers ?

Se troppo corti:

Primer 8-mer: si ha circa 46.000 possibili siti di attacco tra i 3.000.000 kb di sequenza nucleotidica del genoma umano

Primer 17-mer: otteniamo un solo specifico possibile sito di attacco nel genoma umano

Se troppo lunghi:

Bassa efficienza della PCR: primer lunghi si legano a velocità più lenta.

In pratica, primer > 30-mer si usano raramente.

Thermostable Polymerases

Polymerase	T ½, 95°C	Extension Rate: nt/sec	Type of ends	Source
<i>Taq pol</i>	40 min	75	3'A	<i>T. aquaticus</i>
Amplitaq	80 min	>50	3'A	<i>T. aquaticus</i>
Vent*	400 min	>80	95% blunt	<i>Thermococcus litoralis</i>
Deep Vent*	1380 min	?	95% blunt	<i>Pyrococcus GB-D</i>
Pfu	>120 min	60	Blunt	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Tth* (RT activity)	20 min	>33	3'A	<i>T. thermophilus</i>

*Have proof-reading functions and can generate products over 30 kbp

Classificazione dei marcatori genetici : (1)

In base al tipo di informazioni fornite

a) A seconda del genoma su cui mappano:

Mitocondriale – plastidiale –nucleare:

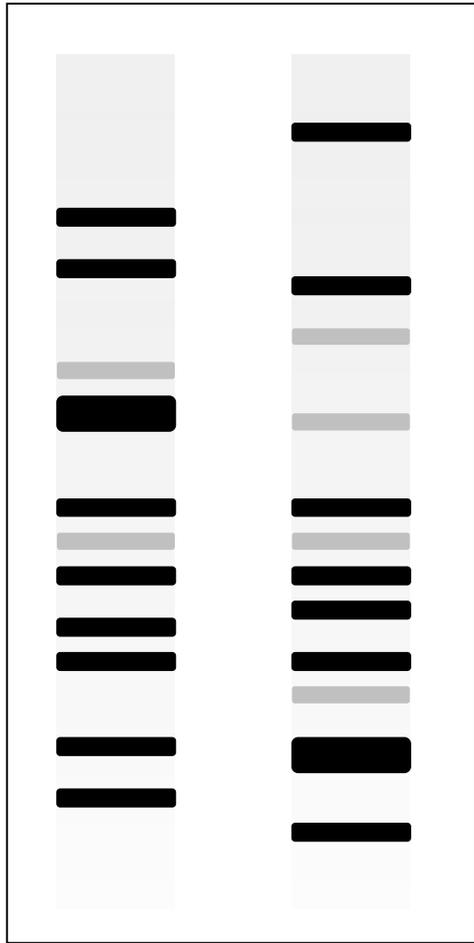
b) Forniscono informazioni su uno o più loci rispettivamente:
singolo locus o multilocus:

c) codominante – dominante

d) Se il polimorfismo osservato è il risultato dell'evoluzione neutrale o è dovuto a processi selettivi: neutrale o adattivo

Multi-Locus

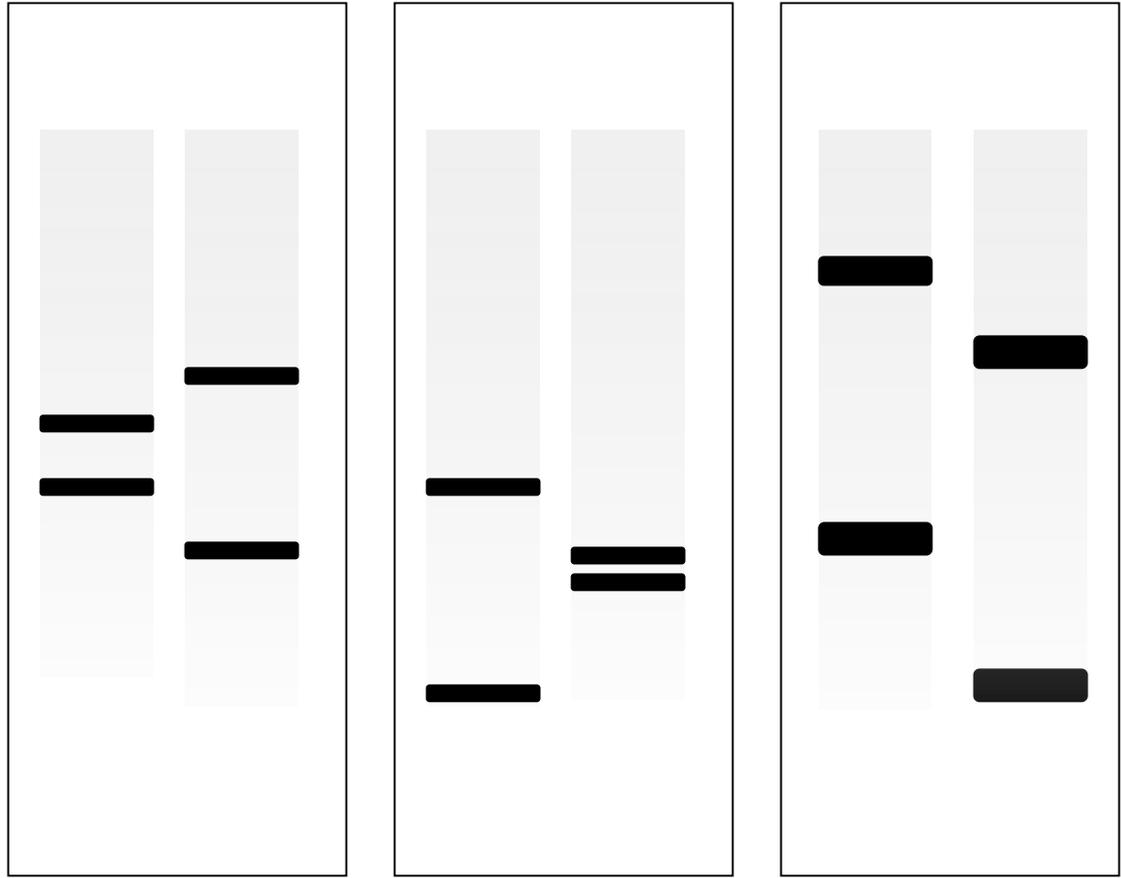
(Originally developed by Alec Jeffreys)



Complex patterns

Single-Locus

Probe 1 Probe 2 Probe 3



D1S7

D2S44

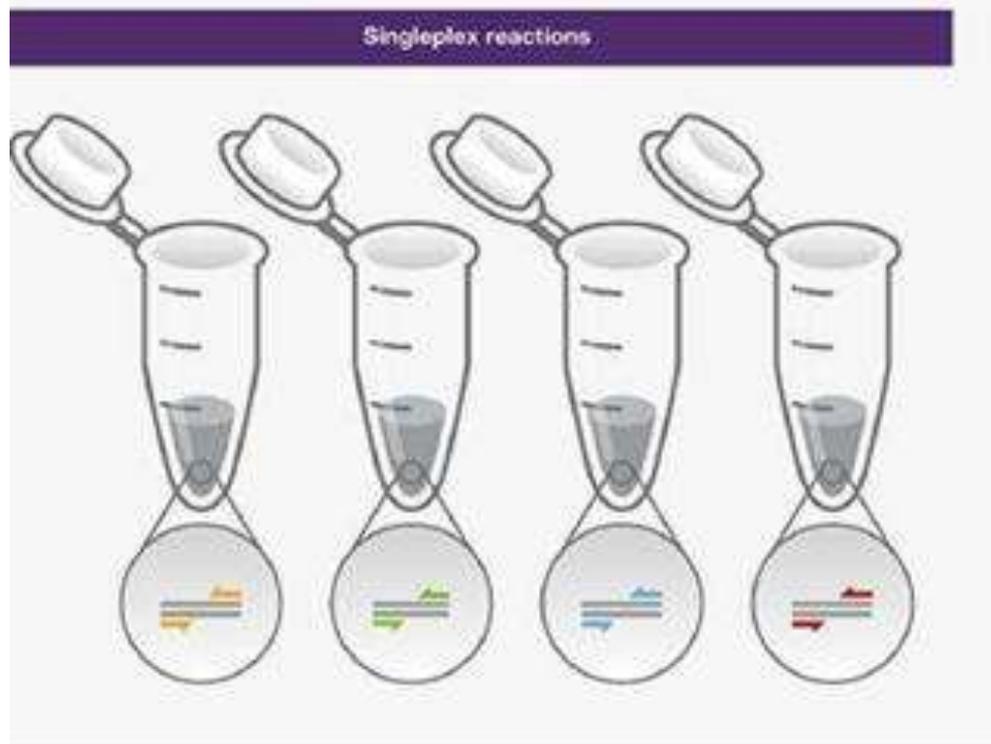
D4S139

Better for forensic samples containing mixtures

PCR (singolo locus)

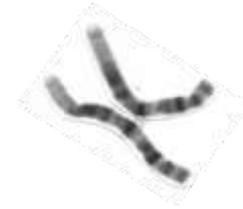
MULTIPLEX PCR (più loci)

DNA Amplification with PCR (1 Locus)

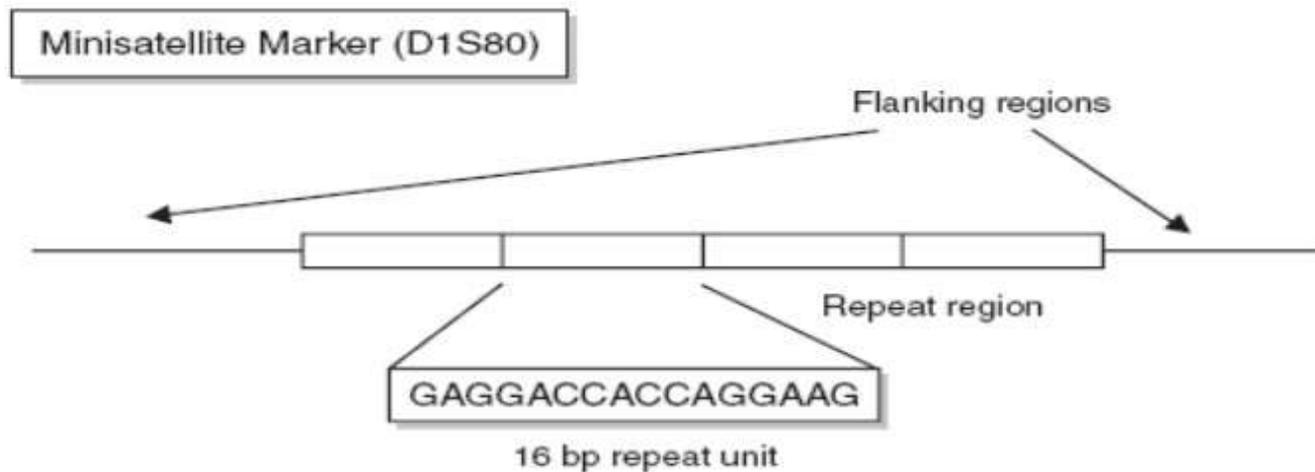


Esempio di PCR per il singolo locus VNTR D1S80

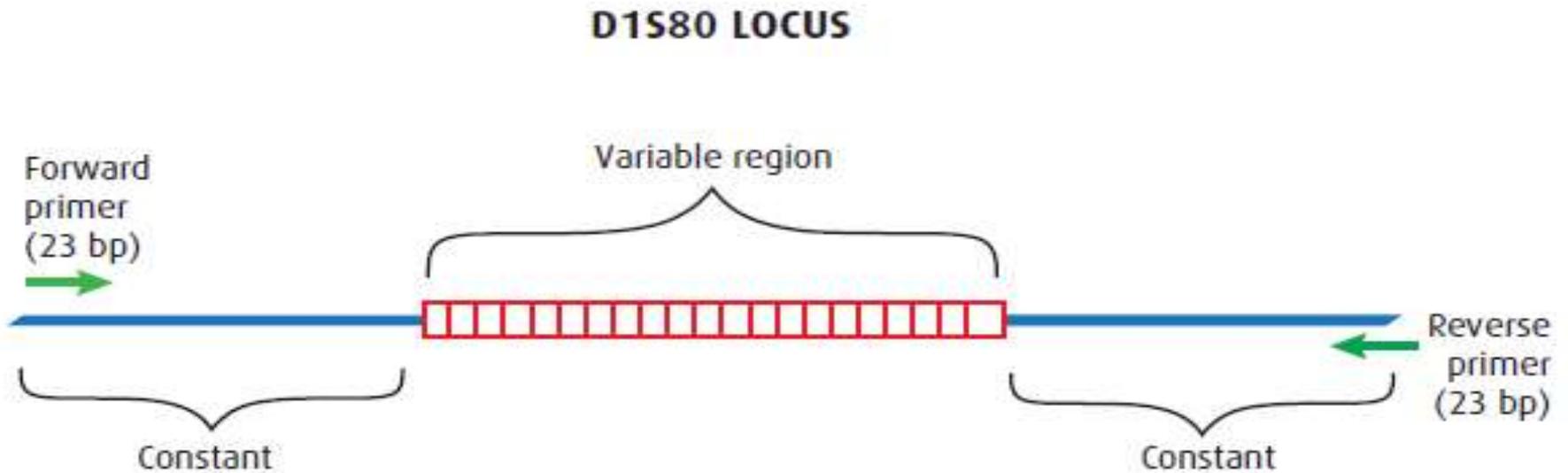
D1S80



- VNTR – non coding region (0,1-20kb)
- Locus sul cromosoma 1
- N° repeats varia da persona a persona (14 a 41 copie)=ALLELI
- Repeat (core) è di 16 bp: **GAGGACCACCAGGAAG**



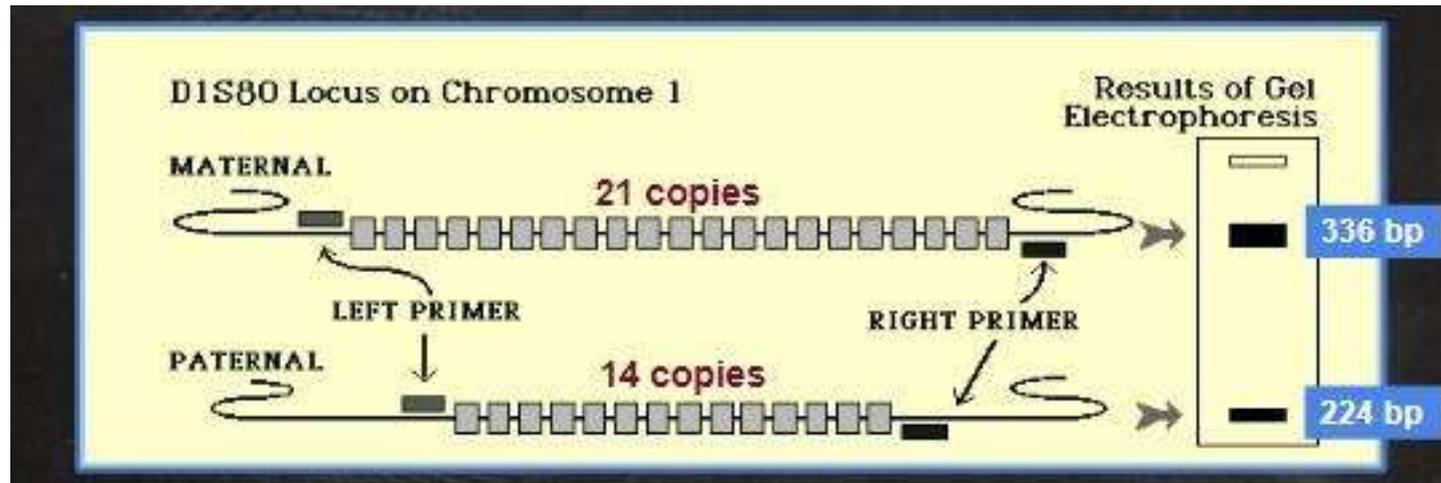
PCR of the D1S80 Region



VNTRs: MARCATORI CODOMINANTI

PCR of the D1S80 Region

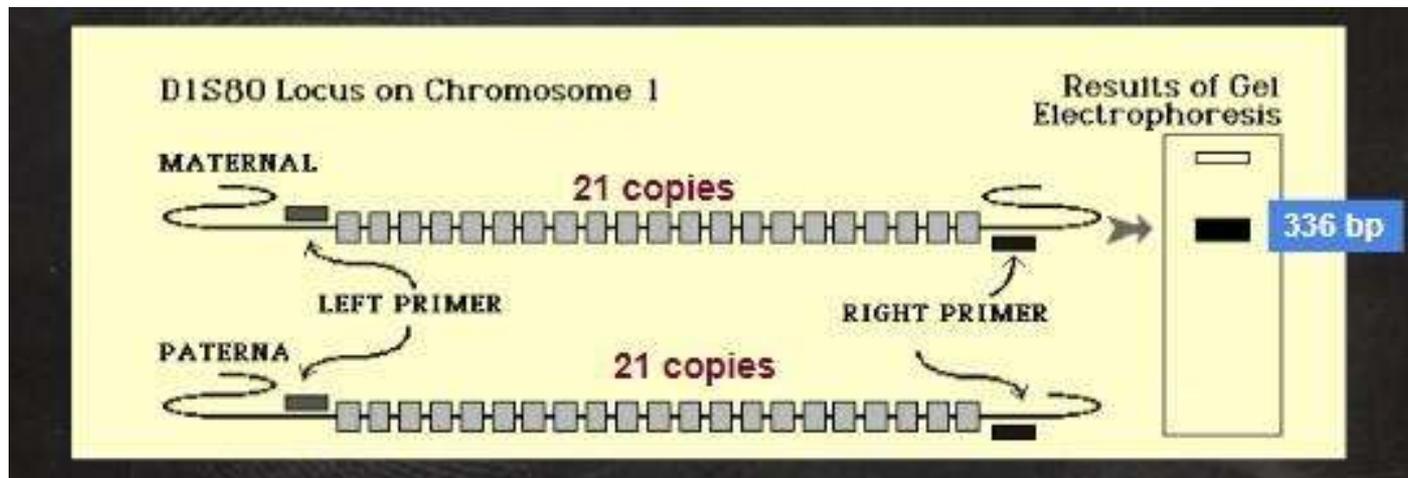
- **Heterozygous** for D1S80 (21-14)
- How many bands will appear on a gel?



PCR of the D1S80 Region

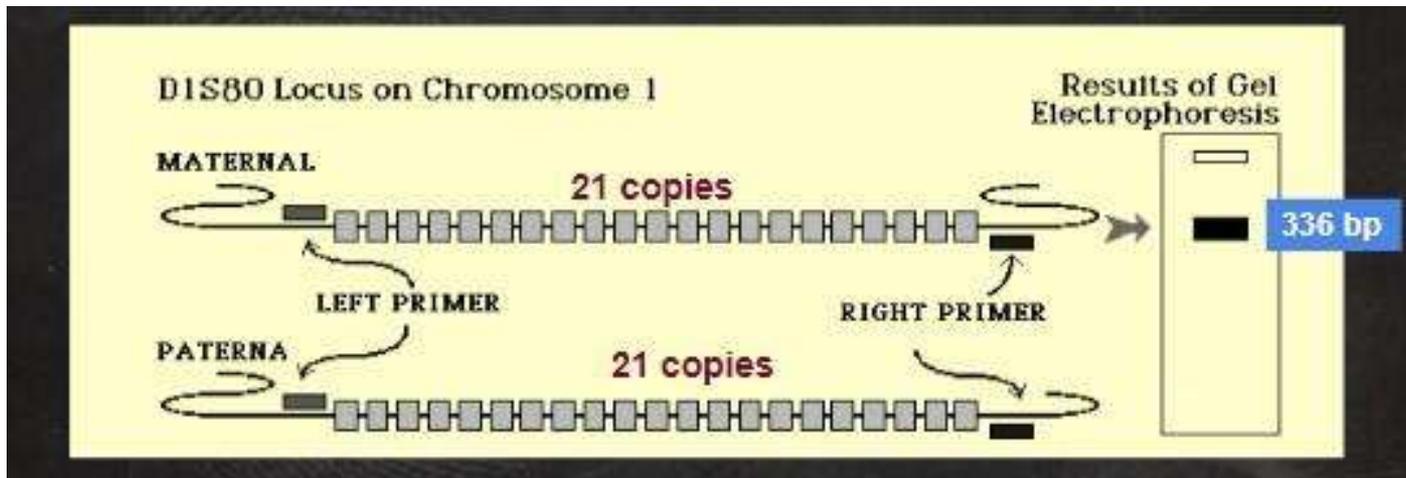
- **Homozygous** for D1S80 (21-21)

How many bands will appear on a gel?

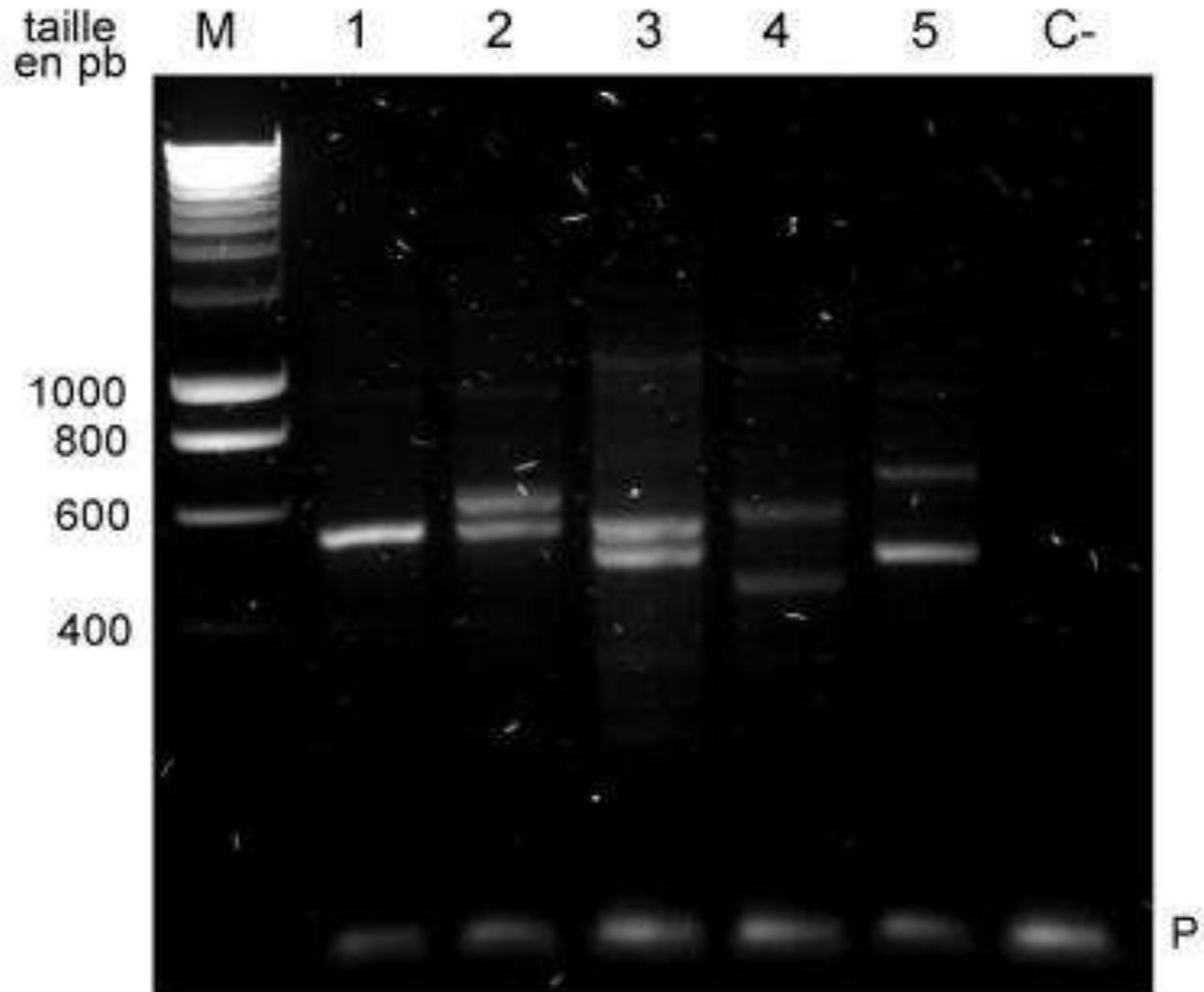


PCR of the D1S80 Region

- **Homozygous** for D1S80 – 2 copies of the same sized D1S80 regions
- How many bands will appear on a gel?



PCR of the D1S80 Region



Ricordiamo

DNA STRUCTURE AND THE GENOME

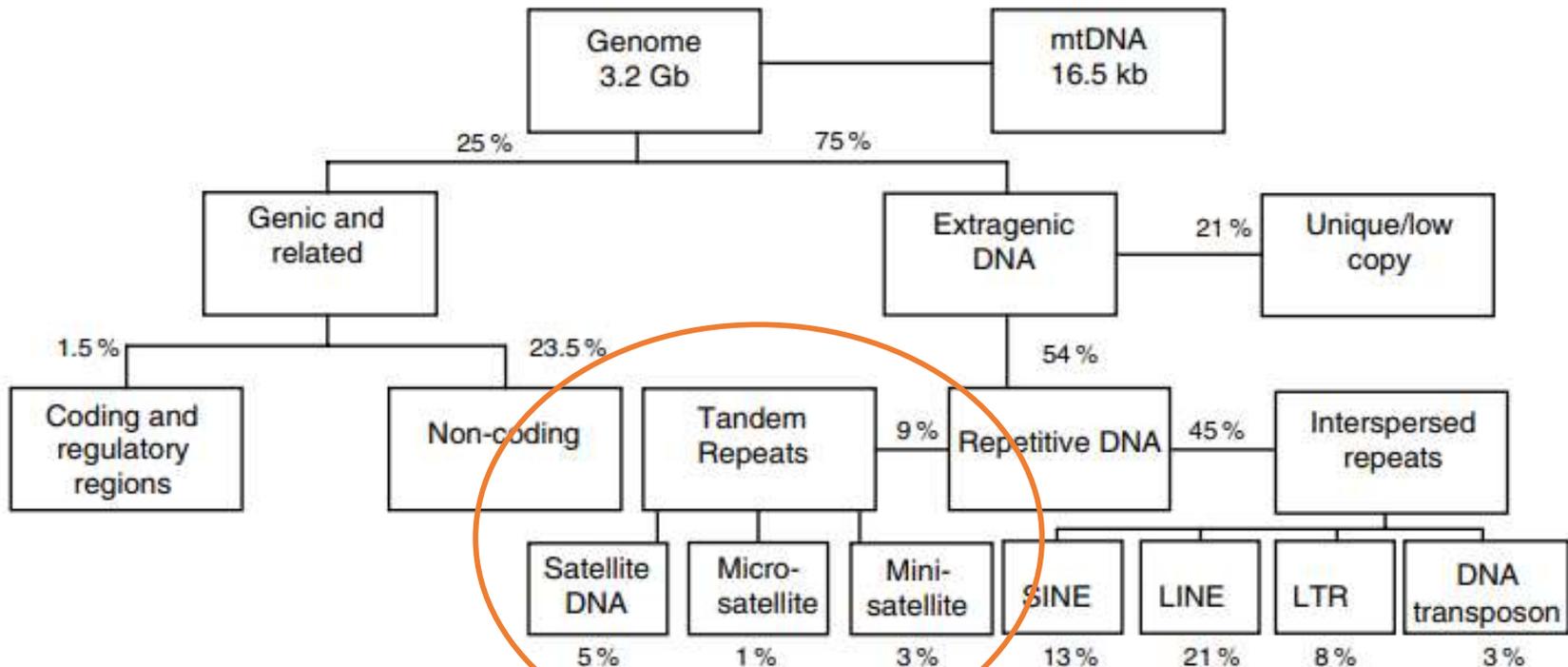


Figure 2.4 The human genome can be classified into different types of DNA based on its structure and function. Modified with permission from Jasinska, A., and Krzyzosiak, W.J. (2004) Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Letters* 567, 136–141).

Ricordiamo

Classificazione dei marcatori genetici : (2)

In base al loro nome (caratteristiche del locus)

**Es. microsatellite (VNTR), minisatellite (STR),
SNPs, ...)**

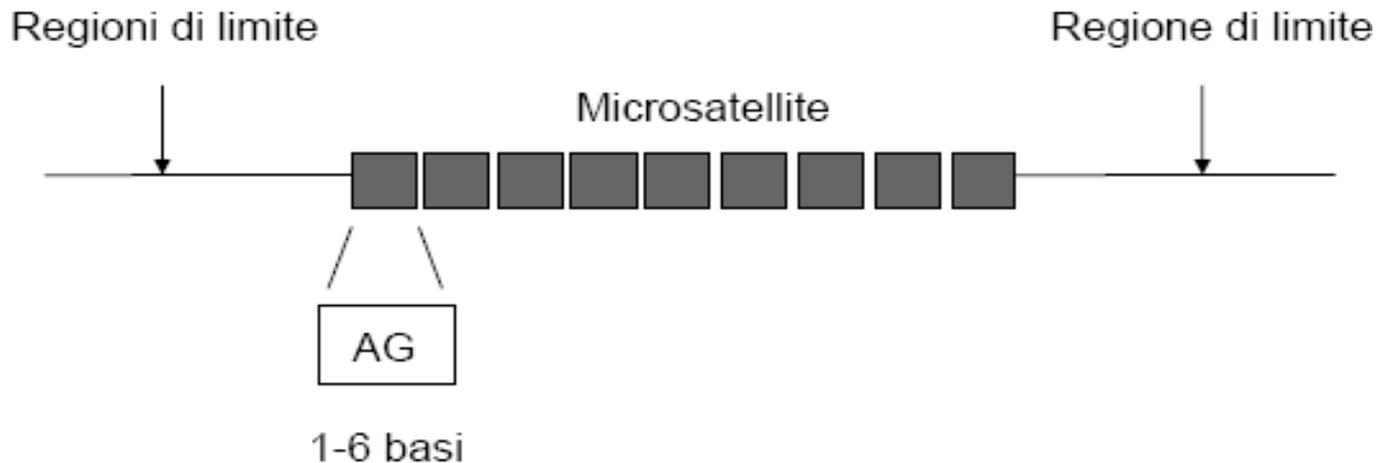
Microsatelliti (STRs o SSR –Short tandem repeat o Simple sequence repeat) (Edwards et al. 1991)

MICROSATELLITI (10-40 sequenze ripetute)

Simple Sequences Repeats (SSRs)

Short Tandem Repeats (STRs)

Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs)



In media si trovano ogni 10,000 basi nel genoma eucariote

STR: lunghezza dell'unità ripetuta

2

Dinucleotide:

CA

3

Trinucleotides

AAT

4

Tetranucleotide:

AGAT

5

Pentanucleotide:

AATGT

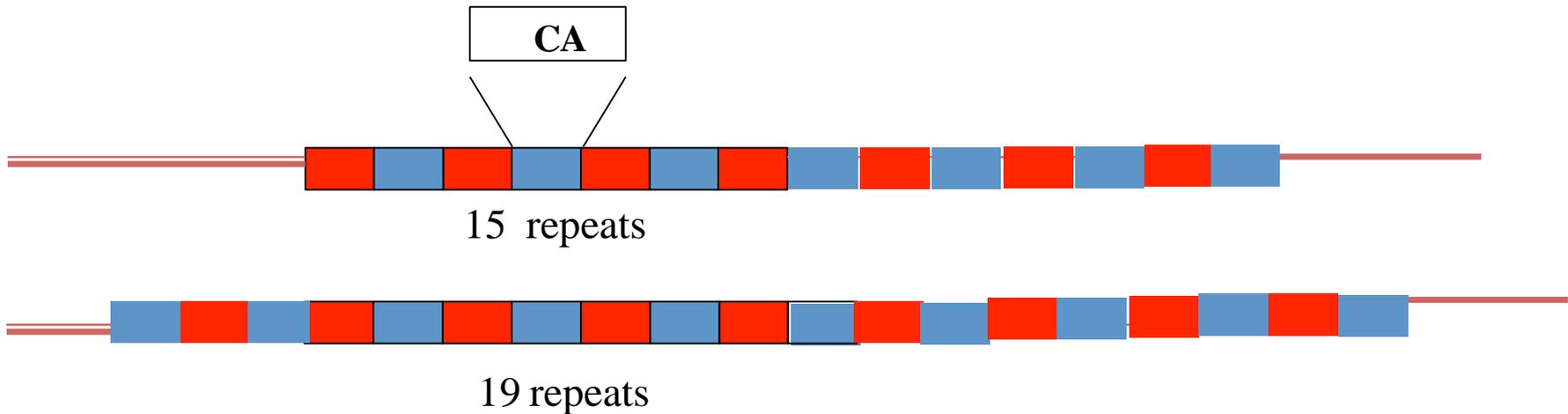
6

Exanucleotide:

AATGTT

STRs: MARCATORI CODOMINANTI

Microsatelliti (STR)



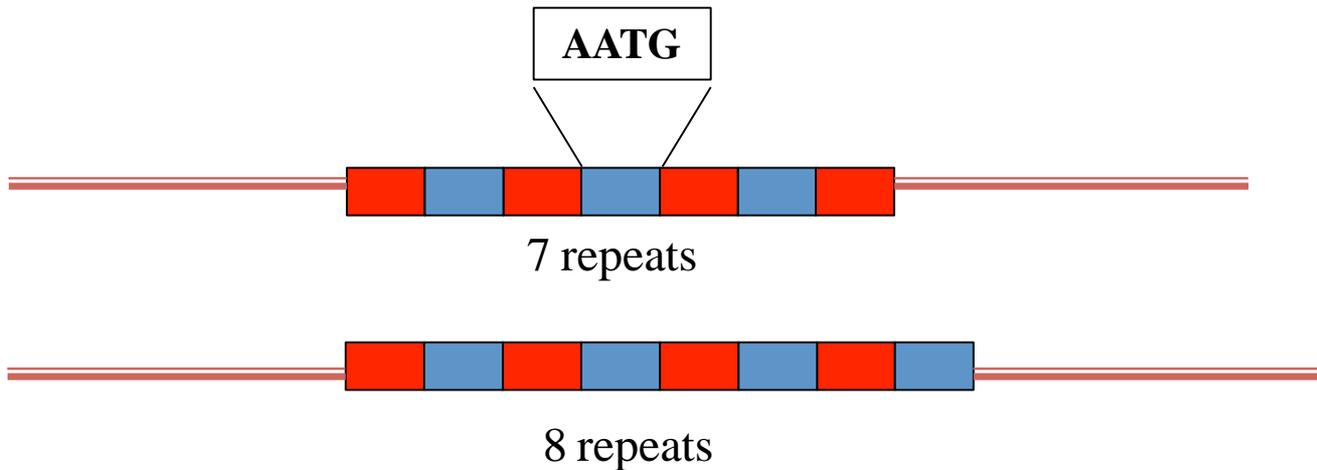
CA= (dinucleotide) core/repeats;

15 repeats= allele 15

19 repeats= allele 19

Eterozigote (15-19) = gli alleli a quel locus STR sono diversi

Microsatelliti (STR)



AATG= (tetranucleotide) core/repeats;

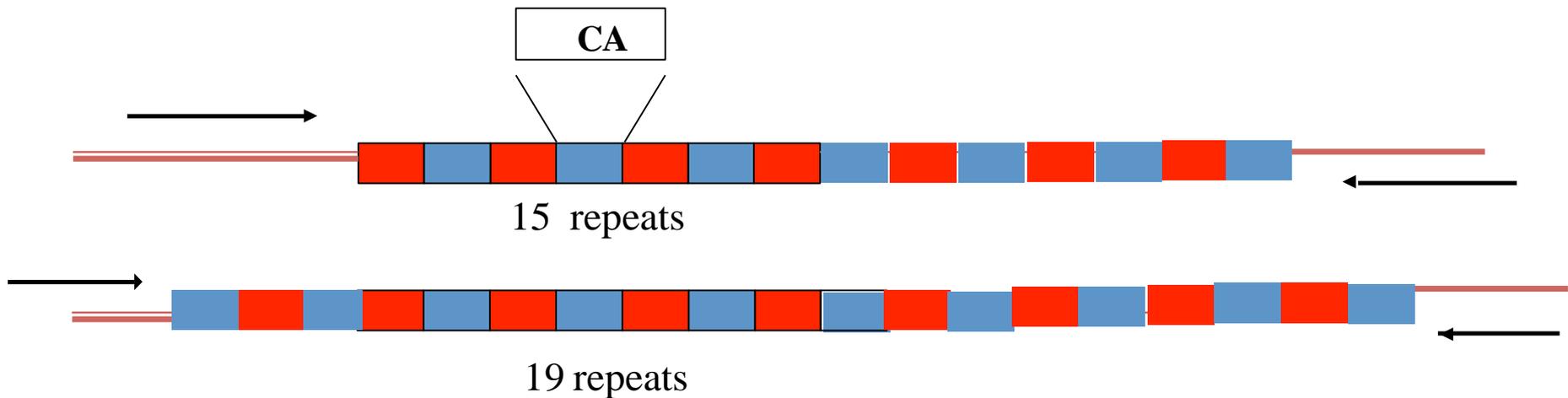
7 repeats= allele 7

8 repeats= allele 8

Eterozigote (7-8) = gli alleli a quel locus STR sono diversi

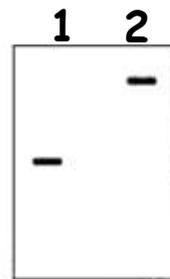
Microsatelliti (STR) e PCR

Si determinano le sequenze UNICHE che fiancheggiano il microsatellite per disegnare i PRIMERS per la PCR



Si amplifica il gDNA da saggiare con i primers selezionati e si analizza su gel di agarosio

CODOMINANTI!



Genotipizzazione: l'allele 15 è *distinguibile* dall'allele 19

Il microsatellite 'ideale' (scienze forensi)

- 1) Con elevata eterozigosità (>> **discriminazione**)
- 2) Amplificabile in corti prodotti PCR (**x DNA degradato**)
- 3) I cui alleli siano ben separabili
- 4) Che presenti un ridotto fenomeno di extra bande (stuttering)
- 5) Con tasso di mutazione contenuto (**x paternità**)
- 6) situato su autosomi (→ **indipendenza statistica dei loci**)

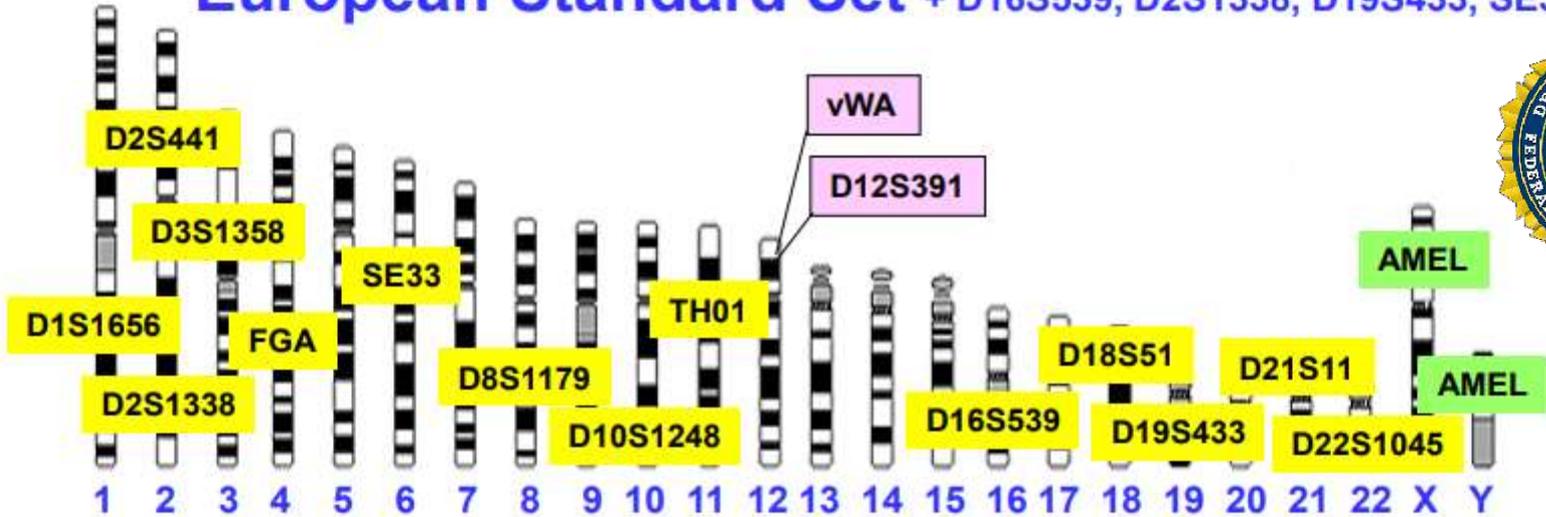
La comunità forense si è orientata principalmente su microsatelliti del tipo tetranucleotide repeats autosomici

Position of Forensic STRs Markers on Human Chromosomes

CODIS: Combined DNA Index System

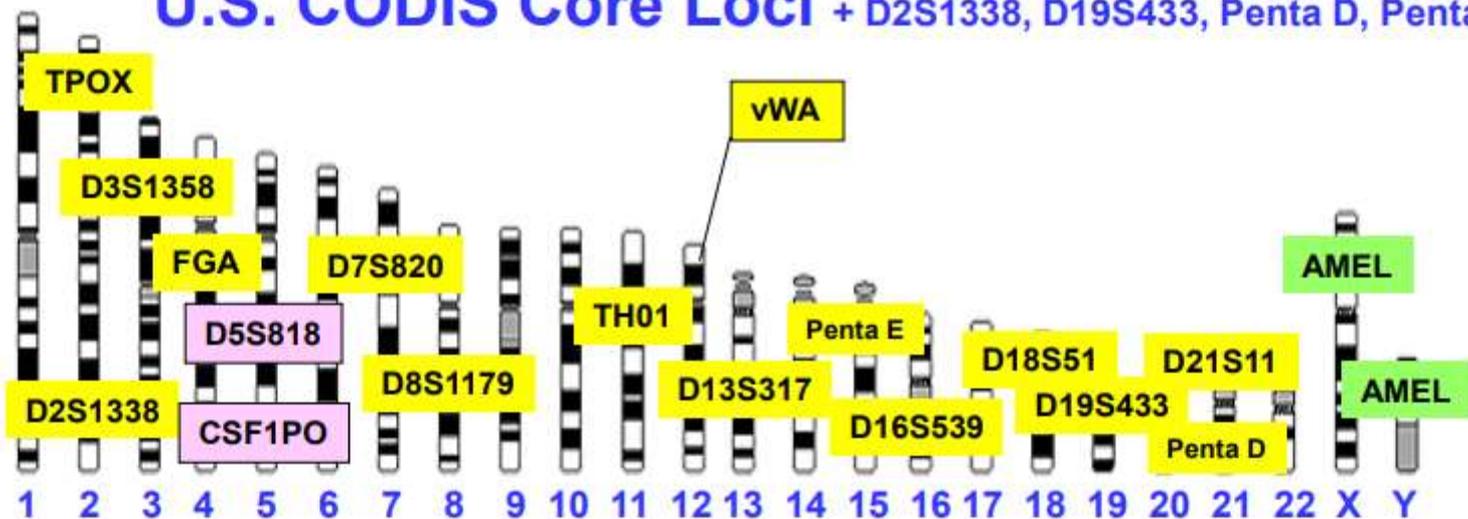
European Standard Set + D16S539, D2S1338, D19S433, SE33

Europe



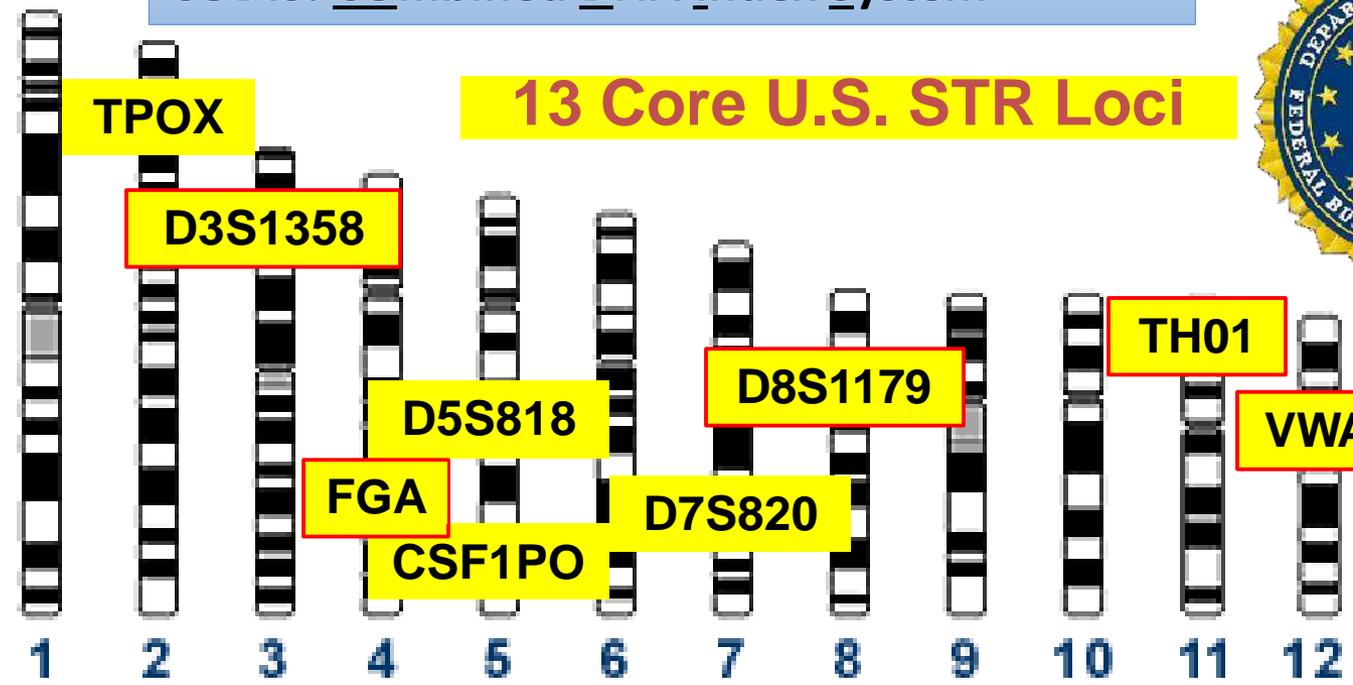
U.S. CODIS Core Loci + D2S1338, D19S433, Penta D, Penta E

United States



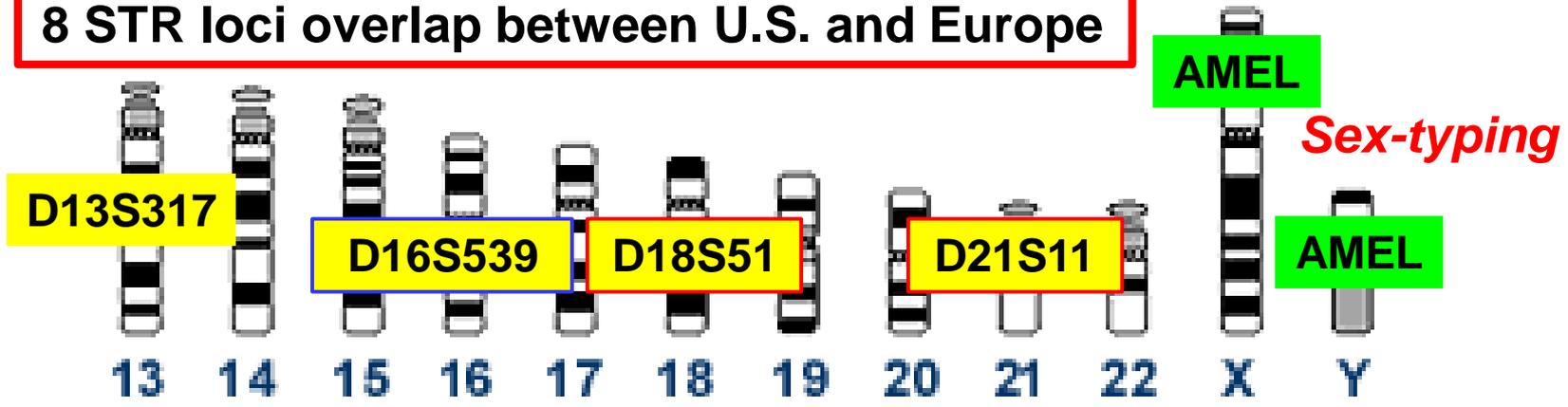
Position of Forensic STR Markers on Human Chromosomes

CODIS: Combined DNA Index System



1997

8 STR loci overlap between U.S. and Europe



Ricordiamo

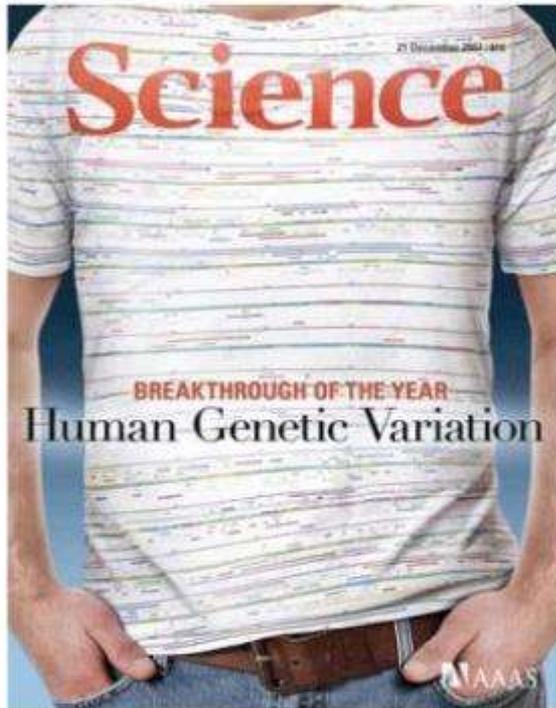
Classificazione dei marcatori genetici : (2)

In base al loro nome (caratteristiche del locus)

**Es. microsatellite (VNTR), minisatellite (STR),
SNPs, ...)**

2007 SCIENTIFIC BREAKTHROUGH OF THE YEAR

Science Magazine, December 21, 2007



“It’s all about me!”

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

SNP



SNP



Individual 1

Individual 2

Individual 3

Individual 4

A A C A **C** G C C A T T C G **G** G G T C

A A C A **C** G C C A T T C G **A** G G T C

A A C A **T** G C C A T T C G **G** G G T C

A A C A **C** G C C A T T C G **G** G G T C

Varianti comuni nella popolazione

Polimorfismi o varianti polimorfiche nel DNA: SNP e SNV

Variazione di uno o pochi nucleotide

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

- In qualsiasi posizione, in ogni individuo (ben caratterizzati)
- Hanno una certa frequenza in una popolazione e
- Validati in una popolazione
- Catalogati nel dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) e altri cataloghi

SNV: Single Nucleotide Variation

- Alterazioni in un singolo individuo (non ben caratterizzati)
- Bassa frequenza
- Non validati in una popolazione

90% delle variazioni genetiche nell'uomo

SNPs sono presenti ogni 100-200 bp nel genoma umano

In media 2/3 SNP sono sostituzioni di una Citosina con una Timina

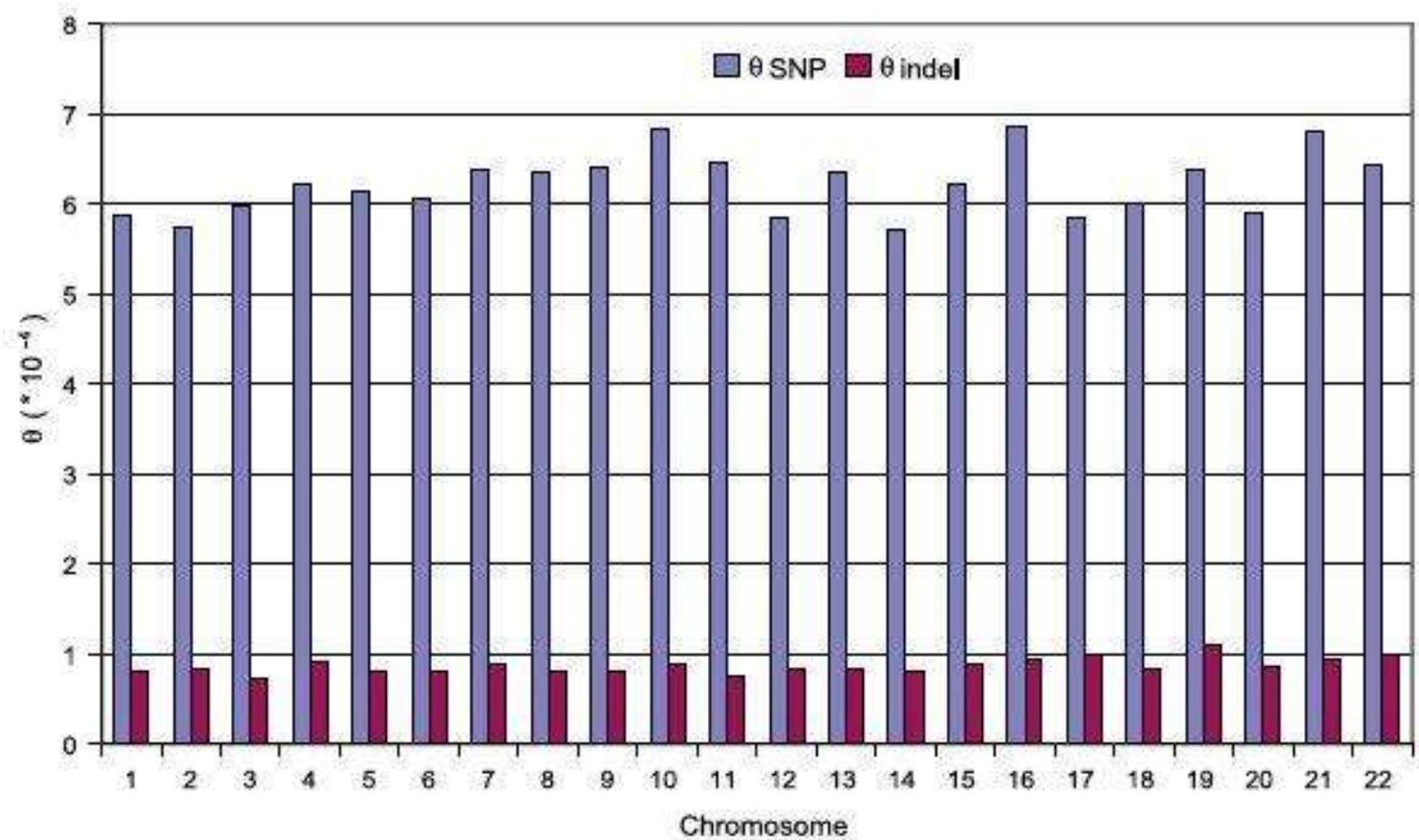
Single (Simple) Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

- Polimorfismo più abbondante

Basso tasso di mutazione: prevalentemente loci
biallelici

- Sono meno variabili se comparati agli STRs
- QUESTO limite è compensato dalla loro frequenza e dalla facilità di isolamento.

SNPs & InDels in HuRef Autosomes



dbSNP at NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

The screenshot displays the NCBI dbSNP website. At the top, the NCBI logo and the text "Single Nucleotide Polymorphism" are visible. A navigation bar includes links for PubMed, Nucleotide, Protein, Genome, Structure, PopSet, Taxonomy, OMIM, Books, and SNP. Below this is a search bar for "Search for SNP on NCBI Reference Assembly" with a "Search Entrez" field containing "SNP" and a "Go" button. A sidebar on the left contains a "BUILD 127" announcement, a "GENERAL" menu with links like "Contact Us" and "Site Map", and "SNP SUBMISSION" and "DOCUMENTATION" sections. The main content area features a "dbSNP Search Options" section with tabs for "Entrez SNP", "ID Numbers", "Submission Info", "Batch", "Locus Info", and "Between Markers". A yellow "ANNOUNCEMENT" box contains the text: "03/18/2007: b127 XML EMERGENCY UPDATE" and "Attention dbSNP user: We have discovered an error in our assignment of functional class as it appears in the b127 XML files. The processing error affects approximately 380,000 SNPs." Below the announcement is a "Search by IDs on All Assemblies" section with a note: "Note: rs# and ss# must be prefixed with 'rs' or 'ss', respectively (i.e. rs25, ss25)". It includes a search input field, a "Reference cluster ID(rs#)" dropdown, and "Search" and "Reset" buttons. At the bottom, a "Submission Information" section lists filters: "By Submitter", "New Batches", "Method", "Population", "Detail (Description, Handle, and ID)", "Class (Based on geographic location)", and "Publication".

NCBI Single Nucleotide Polymorphism

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM Books SNP

Search for SNP on NCBI Reference Assembly

Search Entrez SNP for Go

BUILD 127
Have a question about dbSNP? Try searching the SNP FAQ Archive!
Go

GENERAL
Contact Us
Site Map NEW
dbSNP Homepage
Announcements
dbSNP Summary
FTP Download
SNP SUBMISSION
DOCUMENTATION
SEARCH
HAPLOTYPE
RELATED SITES

dbSNP Search Options

Entrez SNP ID Numbers Submission Info Batch Locus Info Between Markers

ANNOUNCEMENT
03/18/2007: b127 XML EMERGENCY UPDATE

Attention dbSNP user:
We have discovered an error in our assignment of functional class as it appears in the b127 XML files. The processing error affects approximately 380,000 SNPs.

Search by IDs on All Assemblies
Note: rs# and ss# must be prefixed with "rs" or "ss", respectively (i.e. rs25, ss25)
Reference cluster ID(rs#)
Search Reset

Submission Information

- [By Submitter](#)
- [New Batches](#)
- [Method](#)
- Population
 - [Detail](#) (Description, Handle, and ID)
 - [Class](#) (Based on geographic location)
- [Publication](#)

SNP/SNV: EFFETTI

Mutazioni sinonime

Cambio nucleotidico

Nessun cambio aminoacidico

Nessun impatto sulla sequenza proteica

Mutazioni non sinonime

Cambio nucleotidico

Cambio aminoacidico

Impatto sulla sequenza proteica

**SNP senza effetti sul gene in cui sono localizzati
possono influenzare:**

- la presentazione clinica di malattie dovute
a mutazioni causali in altri geni
- la risposta ad agenti patogeni
- la risposta a sostanze chimiche: farmacogenetica
- la risposta a diversi tipi di cibo: nutrigenetica

Single (Simple) Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

scalare

Sostituzione

scavare

spalare

scolare

skalare

Delezione

s-alare

-calare

Inserzione

scaldare

scalmare

scalzare

scalpare

QU3570 M3554GG10 53RV3 4 PROV4R3 CH3 L3
N057R3 M3N71 P0550N0 F4R3 GR4ND1 C053!
C053 1MPR35510N4N71!
4LL'1N1Z10 3R4 D1FF1C1L3, M4 G14' 1N QU3574
R1G4, L4 7U4 M3N73 574 L3GG3ND0
4U70M471C4M3N73 53NZ4 P3N54RC1 5U, 511
ORG0GL1050!

Single (Simple) Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

SNPs

MARCATORI CODOMINANTI

Single (Simple) Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

5' -GCTGTATGAC**T**AGAAAGATCGAT-3'
3' -GCTGTATGAC**G**AGAAAGATCGAT-5'

Single (Simple) Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

5' -GCTGTATGAC**T**AGAAGATCGAT-3'
3' -GCTGTATGAC**G**AGAAGATCGAT-5'

Non-senso = Sostituzione che trasforma un codone in uno di STOP (**UAG; UAA; UGA**)

Frameshift = Indel nella regione codificante che causa lo slittamento della lettura del codice genetico (le più dannose)

•

61 codoni codificano per 20 amino acidi

Codice a triplette --> 4^3
 --> 64 combinazioni

- AUG = Met = **Start**
- UAG } **Stop**
- UAA } **Stop**
- UGA } **Stop**

		Second position				
		U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
	UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop	A	
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C	
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A	
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G	
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C	
	AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
	AUG Met/start	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G	
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C	
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A	
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G	

Genotyping Technologies

1. RFLP
2. PCR (allele specific primers)
3. Primer extension (incorporate labeled nucleotides)
4. microarray
5. Sequencing (whole genome or targeted)
6. Genotyping by sequencing

.....and many other ones !!!

Genotyping Technologies

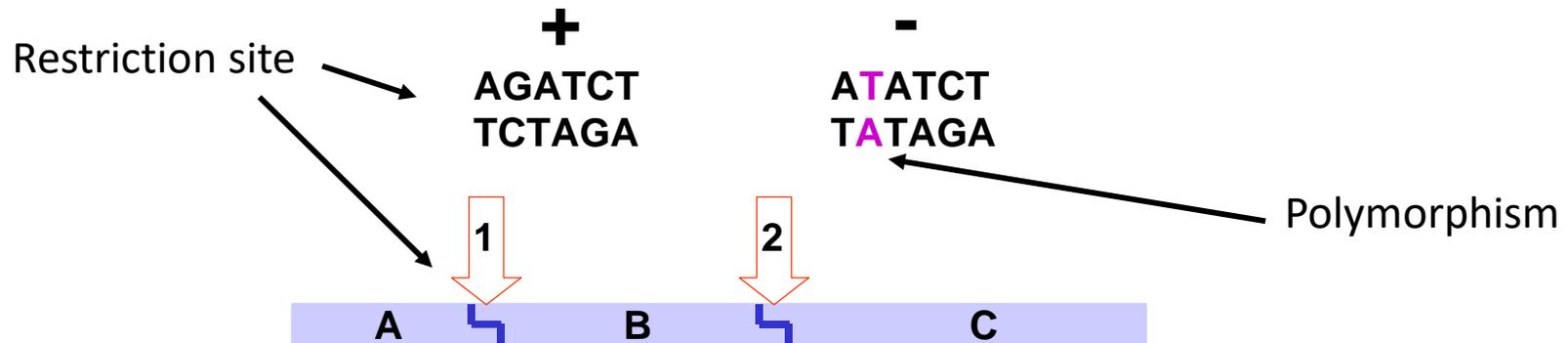
- 1. RFLP**
2. PCR (allele specific primers)
3. Primer extension (incorporate labeled nucleotides)
4. microarray
5. Sequencing (whole genome or targeted)
6. Genotyping by sequencing

.....and many other ones !!!

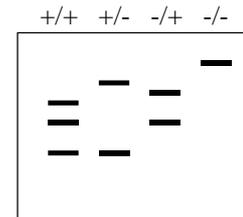
SNP

PCR e Restriction Fragment Length Polymorphisms

The presence of RFLP is inferred from changes in fragment sizes.



1	2	Size	Number
+	+	A,B,C	3
+	-	A, (B+C)	2
-	+	(A+B), C	2
-	-	(A+B+C)	1



Gel band pattern