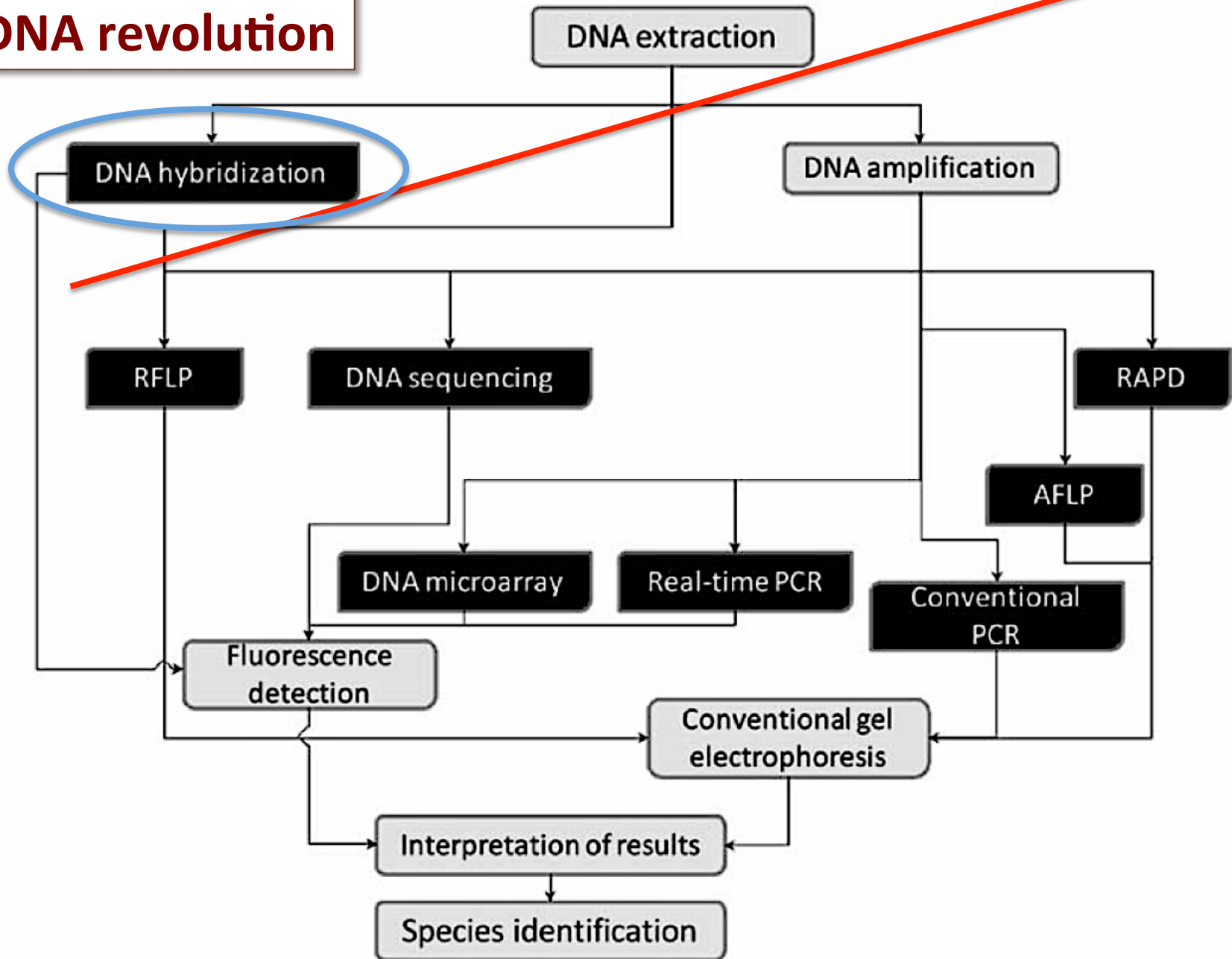


DNA revolution

I marcatori molecolari e il loro contributo alle scienze forensi (I parte)



DNA revolution

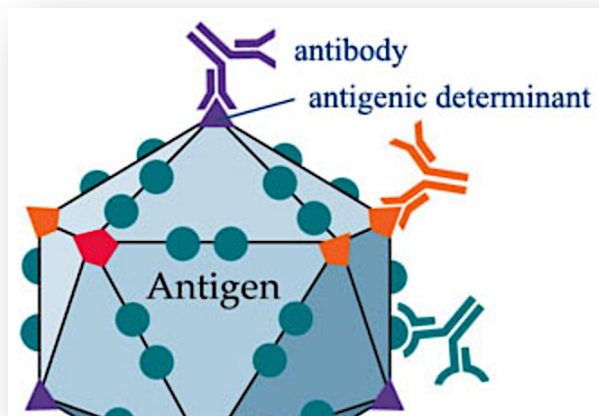


Hybridization

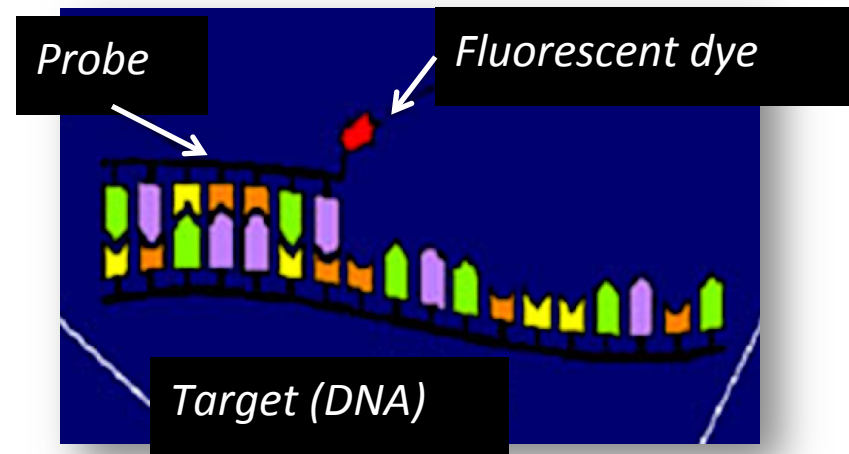
Principio base:

SONDE MOLECOLARI

Reazione immunologica
(antigene-anticorpo)



Complementarietà di sequenza



- Anticorpi o Molecole di DNA o RNA a singolo filamento
- Complementari a regioni di interesse (regioni bersaglio)
- Marcate con fluorofori, cromofori o molecole radioattive

Stabilità dell'ibrido dipende dall'estensione della complementarietà

Hybridization

Test immunocromatografici:

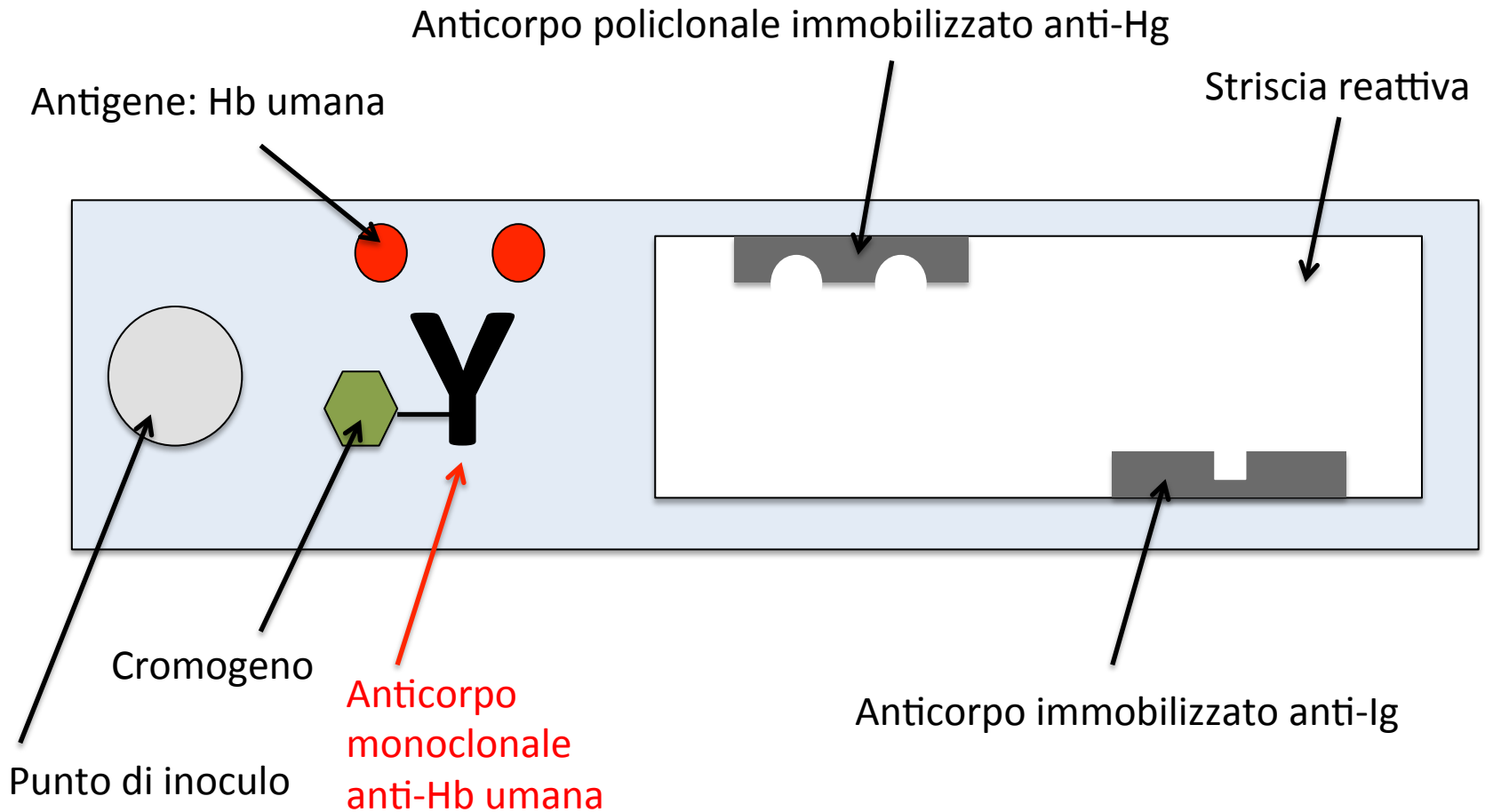
- **Evidenziano la presenza di sangue (emoglobina) o altri ormoni**

Es. Test del sangue occulto nelle feci

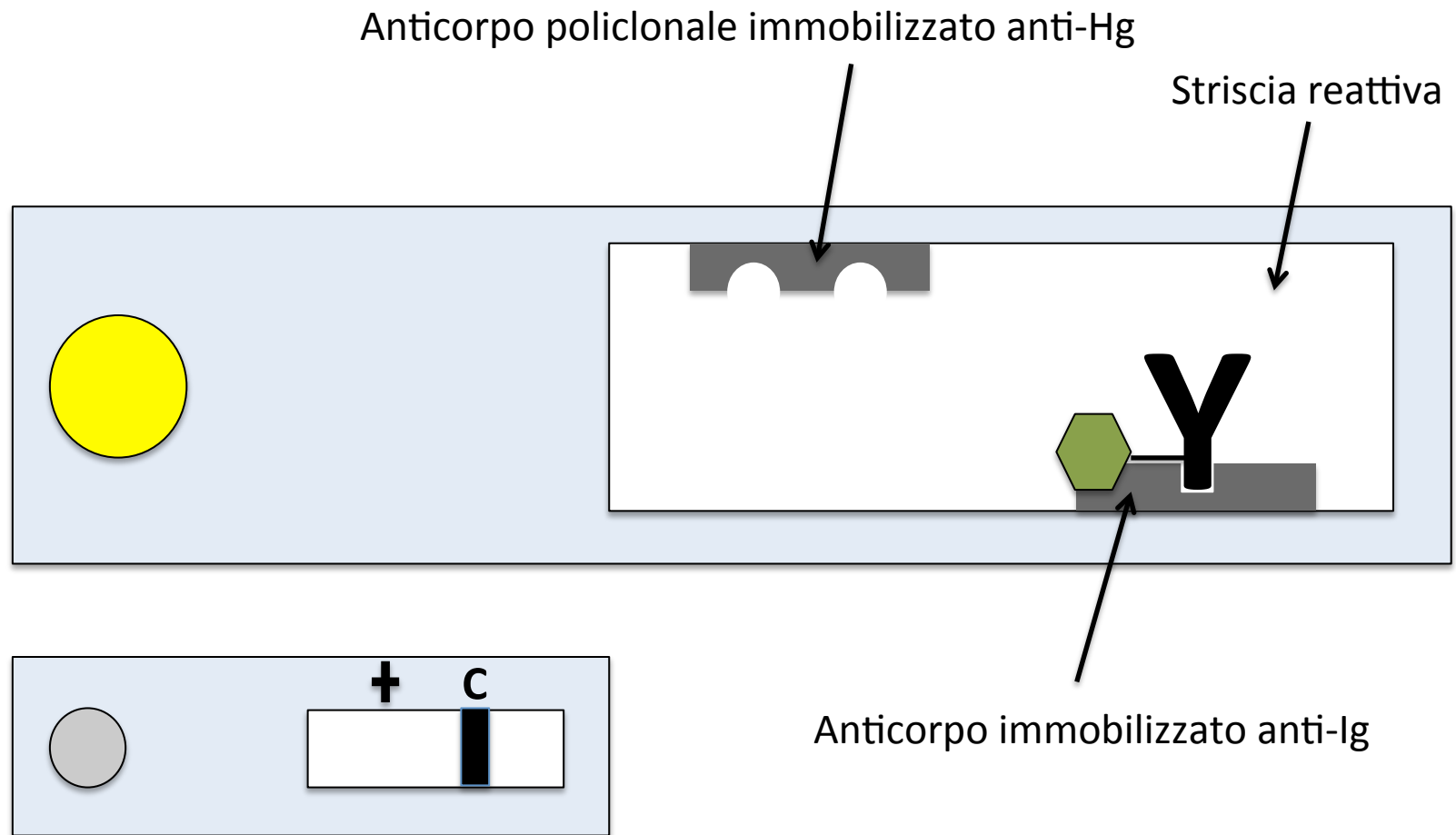
Es. Test di gravidanza (urina)

- Utilizzo di anticorpi monoclonali coniugati con sostanza cromogena
- Poco costosi una volta standardizzati
- Rapidi, risposta immediata
- Non possono stabilire la specie di appartenenza ma solo determinare positività o negatività per un determinato marcatore analizzato

Esempio: Funzionamento di un test immunocromatografico per la rilevazione di sangue umano



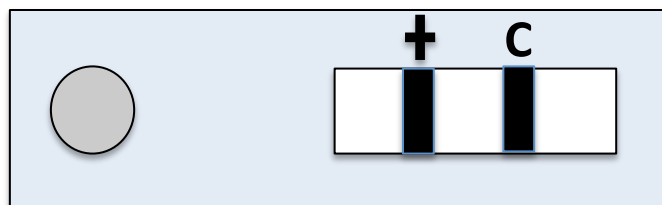
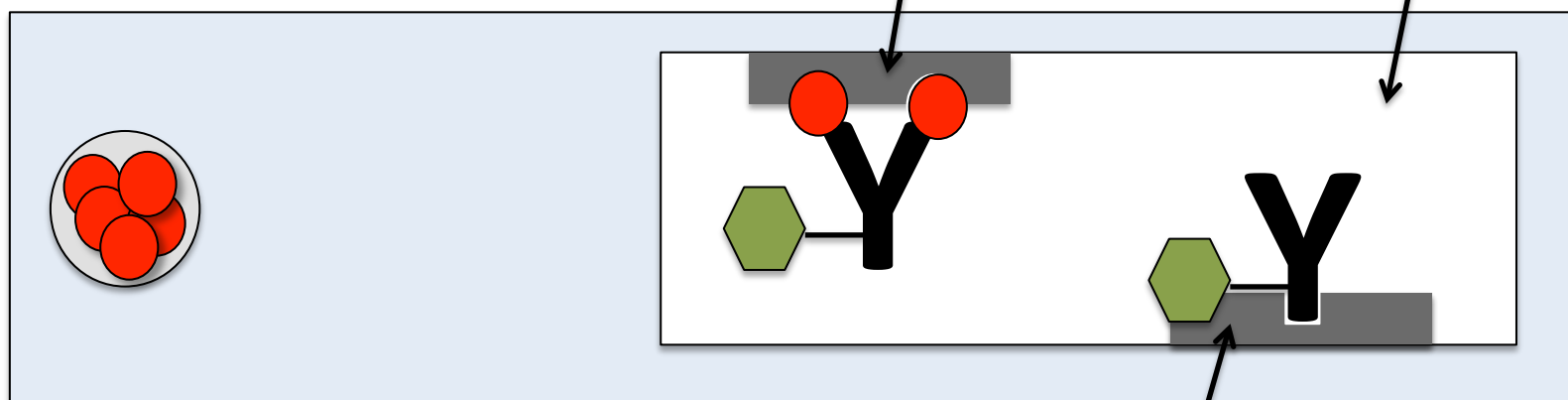
Esempio: Funzionamento di un test immunocromatografico per la rilevazione di sangue umano



Esempio: Funzionamento di un test immunocromatografico per la rilevazione di sangue umano

Anticorpo policlonale immobilizzato anti-Hg

Striscia reattiva

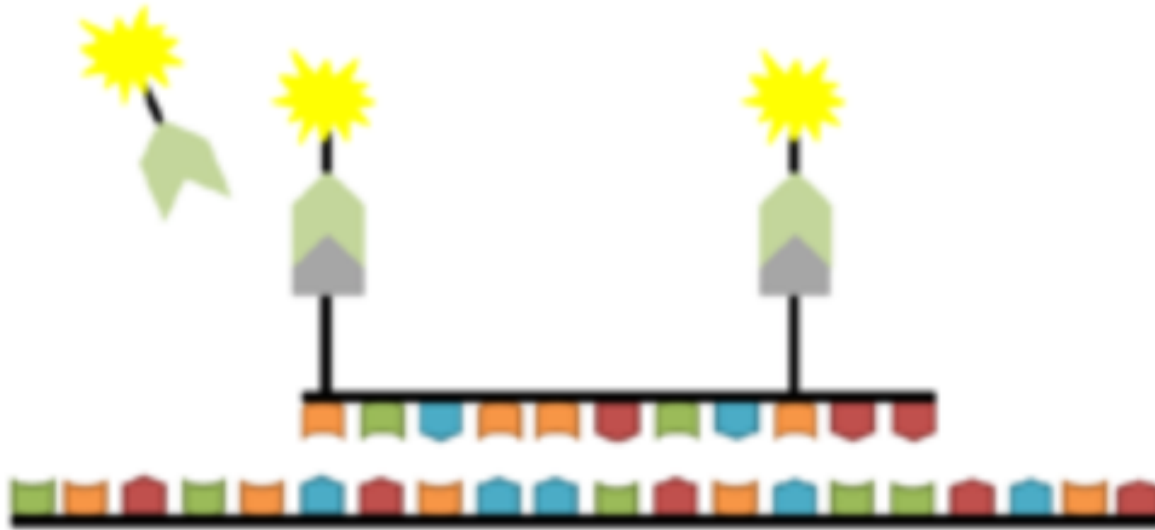


Anticorpo immobilizzato anti-Ig

Hybridization

Ibridazione *in situ*:

- Individuazione di sequenze specifiche di acidi nucleici con **SONDE COMPLEMENTARI MARCATE** di DNA o RNA



- Campione biologico (es. cellule, tessuti)
- Estratti di DNA/RNA fissati su membrane

Hybridization

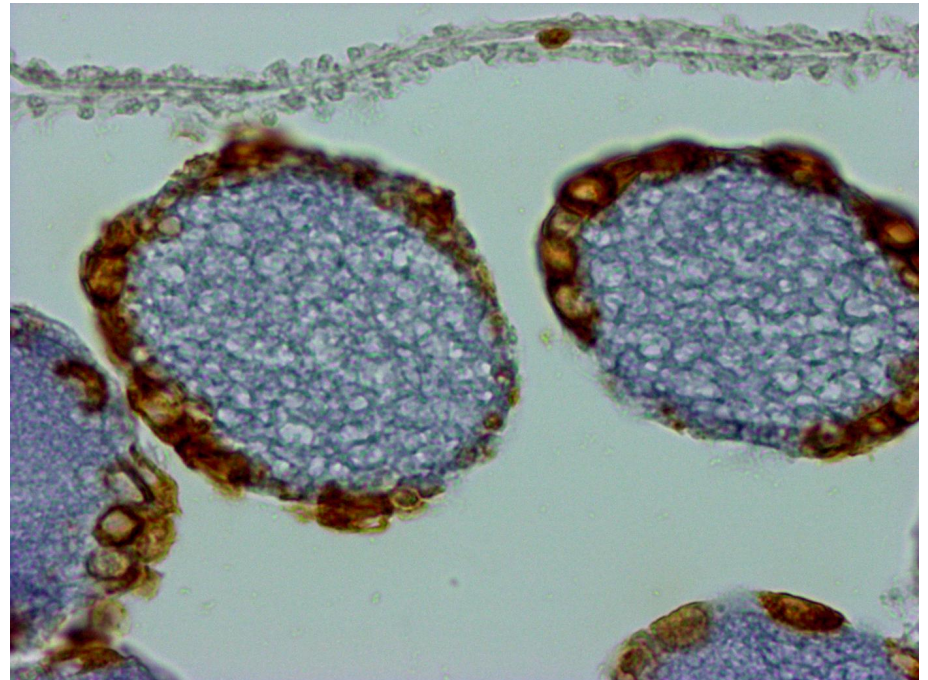
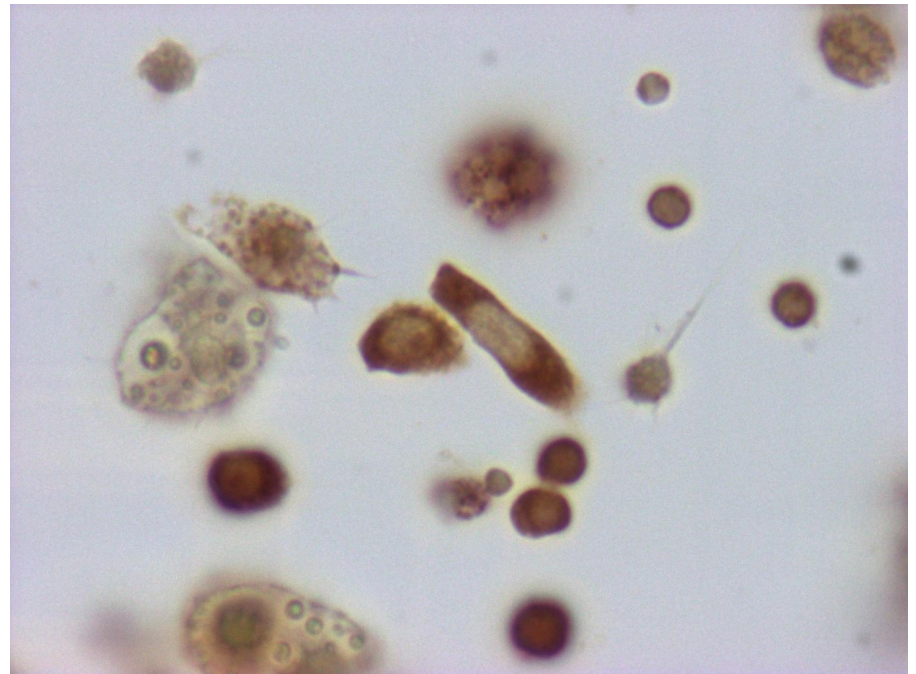
Ibridazione *in situ*:

➤ **Campione biologico**
(es. cellule, tessuti)

Applicabile su:

- **Strisci di cellule**
- **Sezioni istologiche**

Verificare quali cellule
e/o tessuti presentano
la sequenza di
interesse



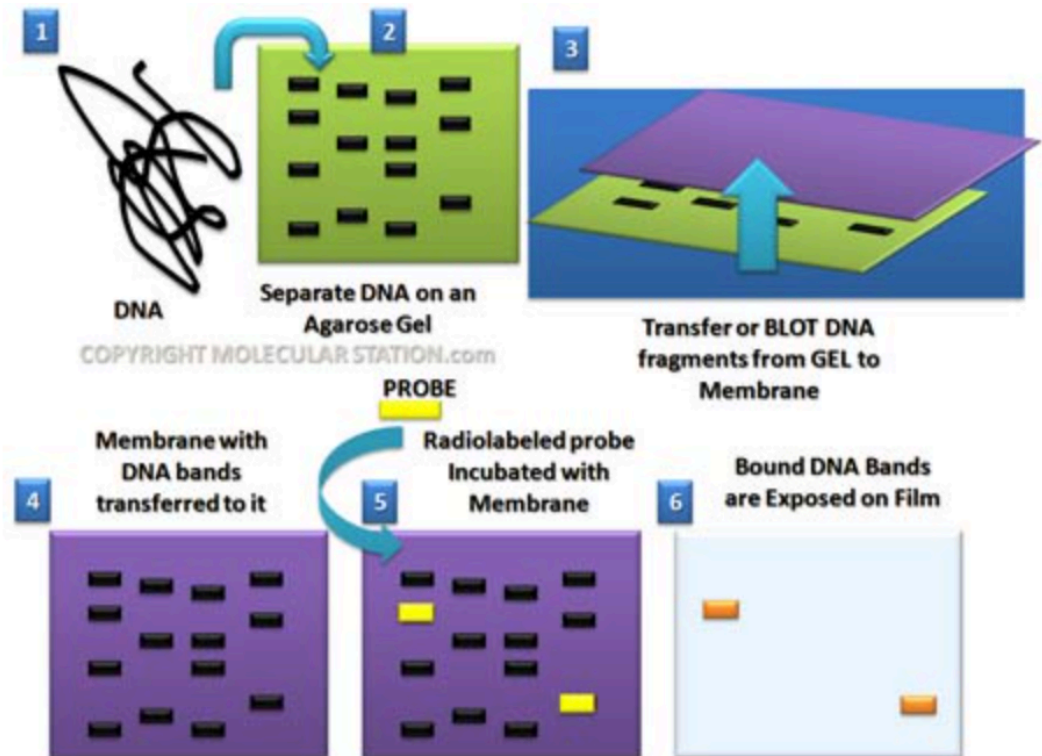
Hybridization

Ibridazione *in situ*:

➤ Estratti di DNA/RNA fissati su membrane

Dopo elettroforesi
trasferimenti per capillarità
o elettroblotting:

- *Southern blotting*
(Trasferimento di DNA su nylon)
- *Northern blotting*
(trasferimento di RNA su nitrocellulosa)



Hybridization

Usi nella storia:

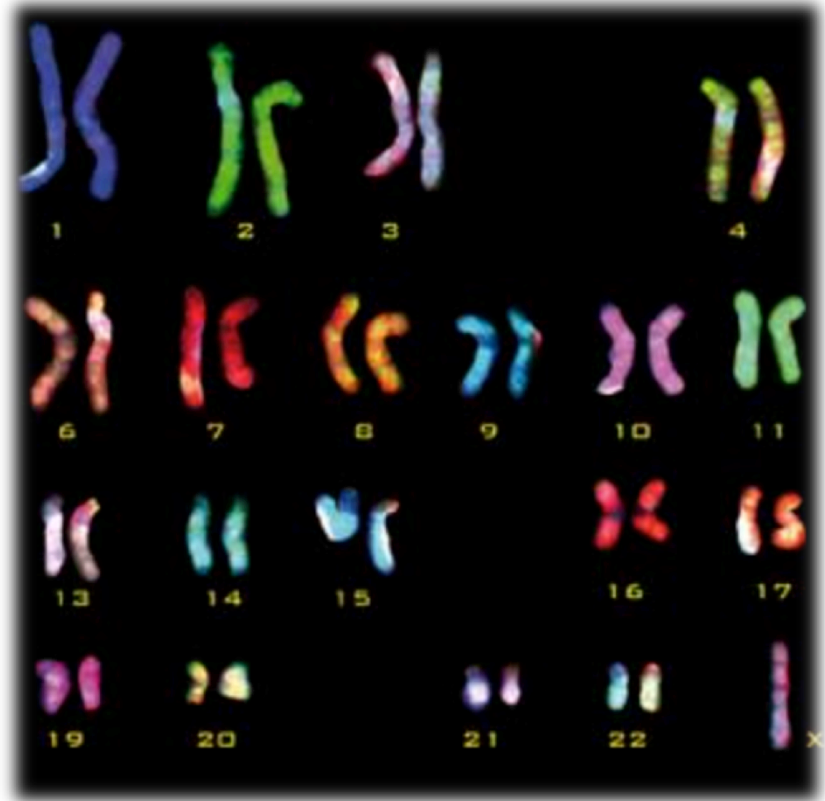
Questa tecnologia ha contribuito all'identificazione e al **clonaggio di geni** e allo studio della **diversità genomica**, attraverso analisi di polimorfismi di restrizione (**RFLP**) e, successivamente, con la tecnologia dell'impronta molecolare (***fingerprinting***).

L'analisi prenatale e la medicina forense sono in molti casi basate ancora sull'ibridazione molecolare, con appropriate sonde, tra DNA e/o RNA derivati da svariate fonti biologiche (Lewin 1997).

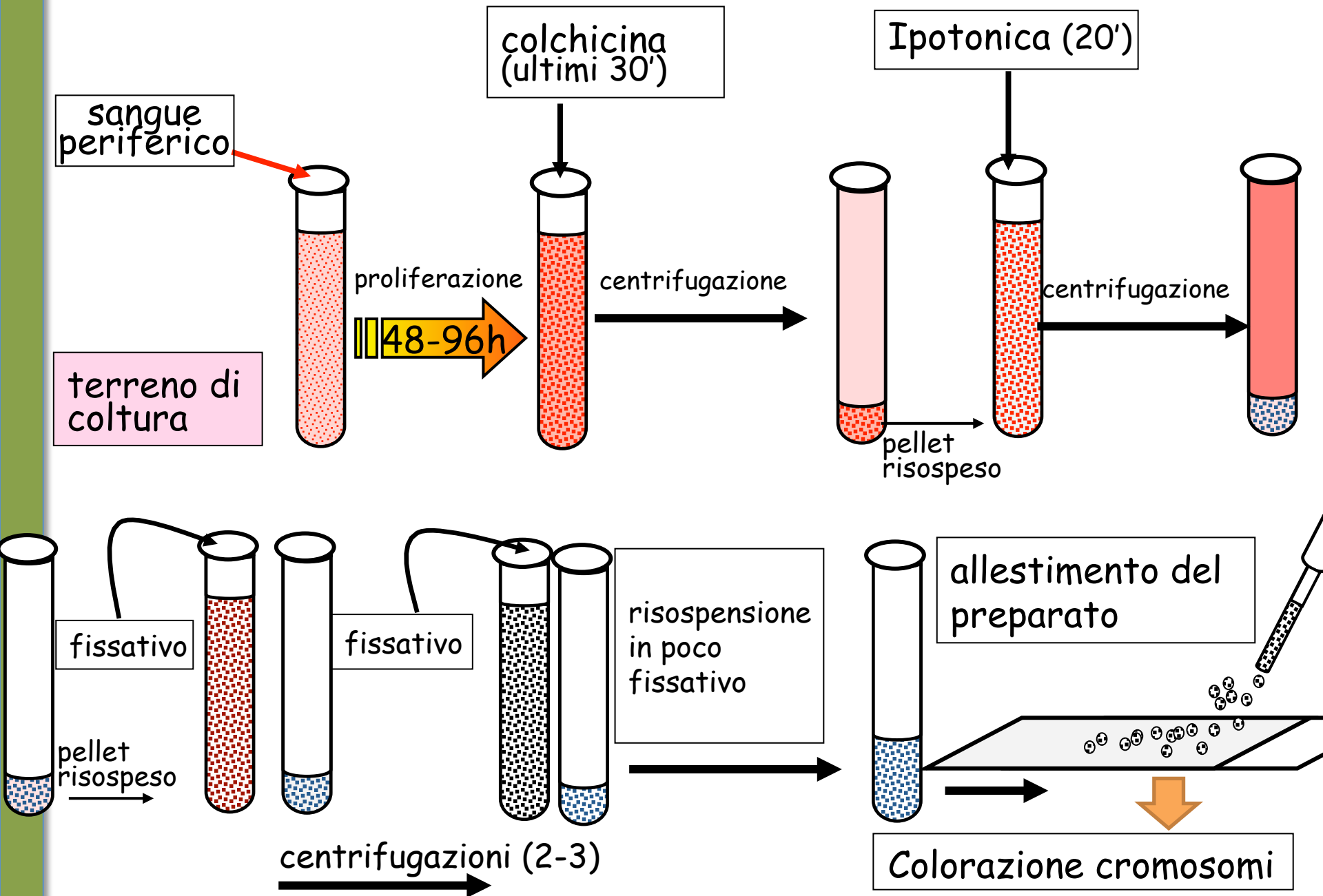
Hybridization

Usi nella storia:

- Studio dei cromosomi umane (cariotipi)
- Valutazione e studio della complessità dei genomi e delle loro anomalie genetiche

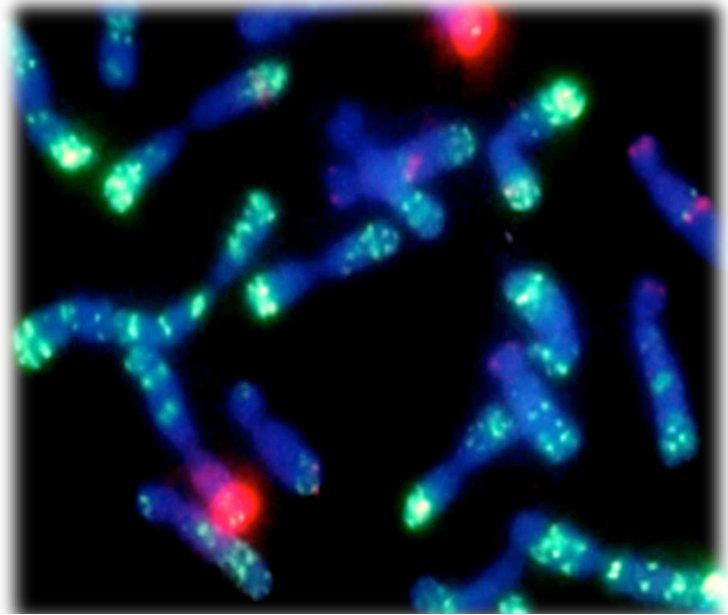


Come si ottiene un cariotipo?



DNA hybridization

ESEMPIO di individuazione di regioni di interesse su cromosomi



ESEMPIO di TRISOMIA



Cromosoma 21

DNA hybridization



Vantaggi:

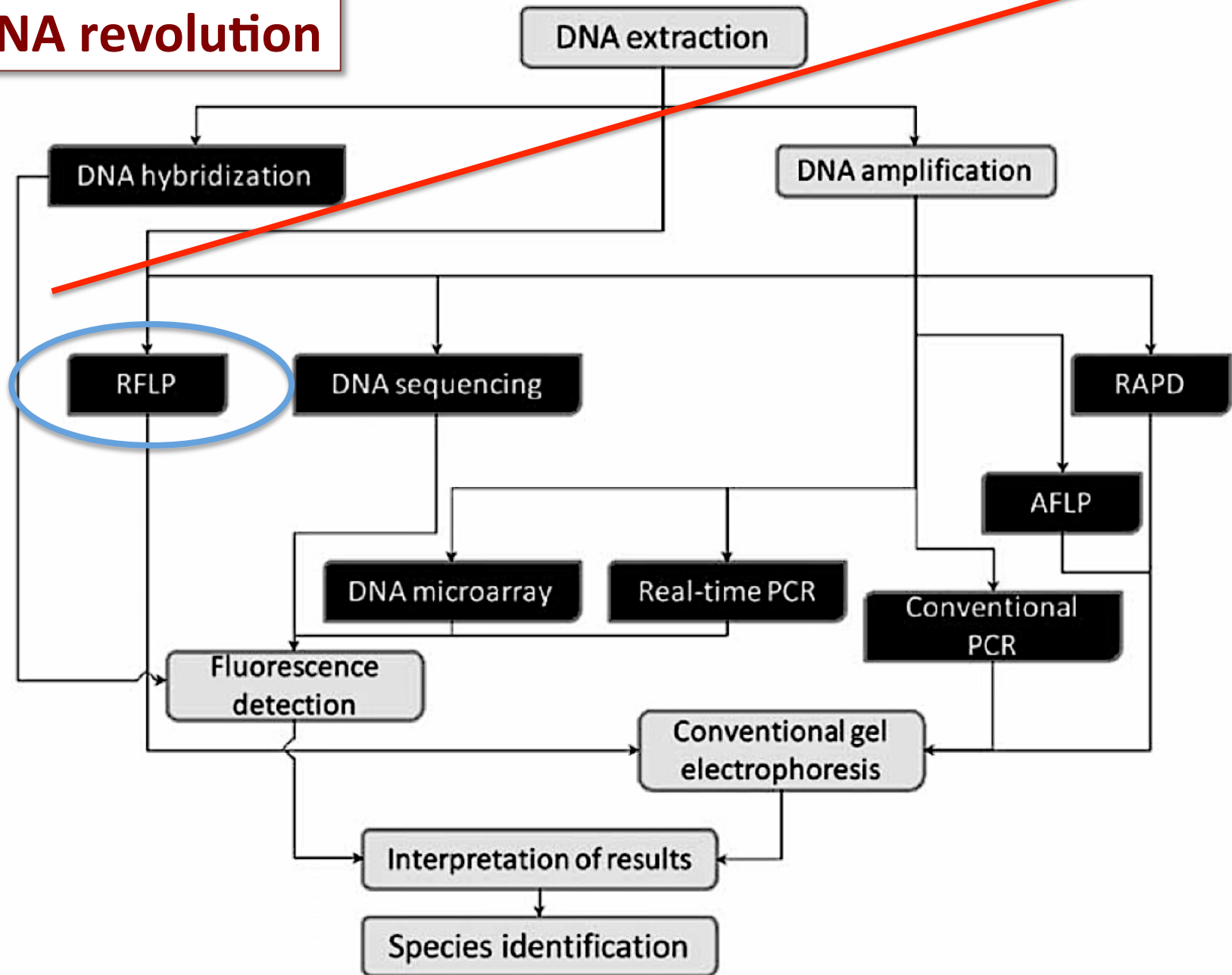
- Identificazione simultanea di **specie multiple** (es. campioni ambientali, flora gastro-intestinale, cavità orale).
- **Elevata stabilità PNA/DNA** (Peptide Nucleic Acid), molecole sintetiche private di carica che limitano la formazione di strutture secondarie

Svantaggi delle ibridazioni DNA-DNA/PNA-DNA:

- Richiede conoscenze a priori delle regioni target
- Non applicabile a DNA degradato
- Scarsa ripetibilità
- Non discriminante in caso di specie filogeneticamente vicine
- Time-consuming
- Costi elevati delle sonde PNA



DNA revolution



RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

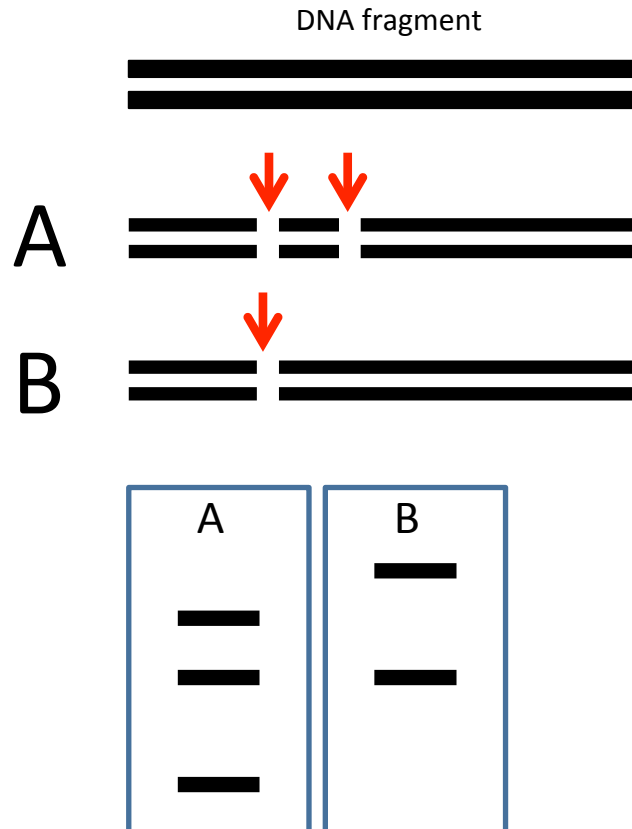
Alec Jeffreys, early '80



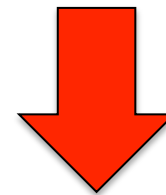
Principio base:

Digestione del DNA con **ENZIMI DI RESTRIZIONE**

I frammenti risultanti sono visualizzati mediante corsa elettroforetica



- Presenza/assenza di uno o più siti di restrizione
- Inserzioni o delezioni tra siti



Differenze tra pattern di bande

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

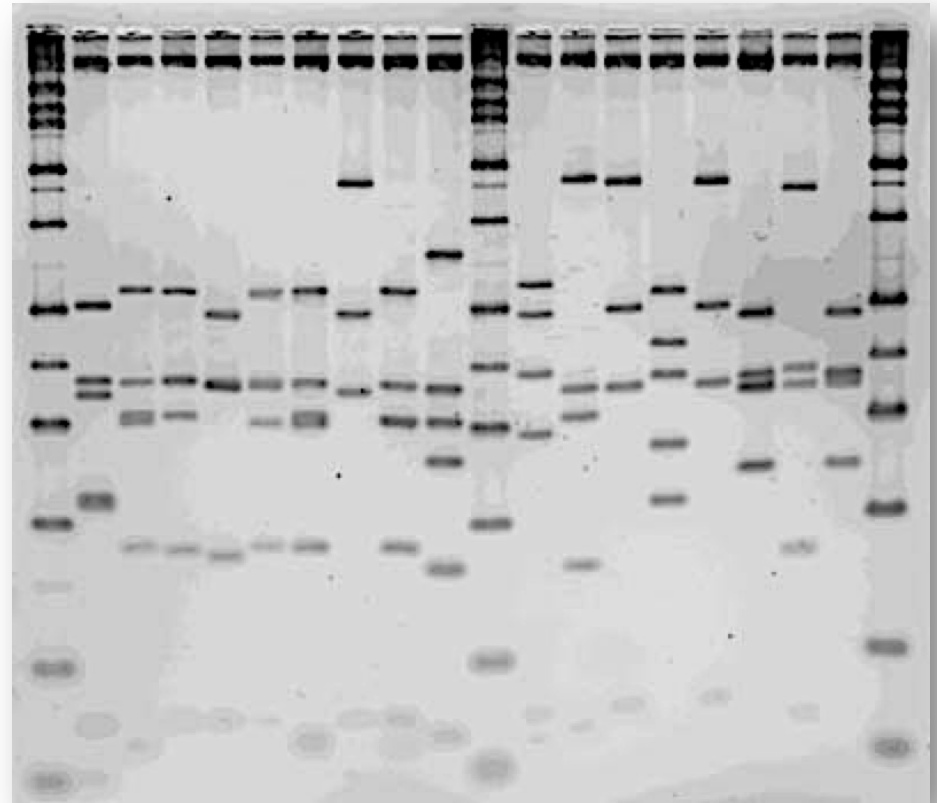
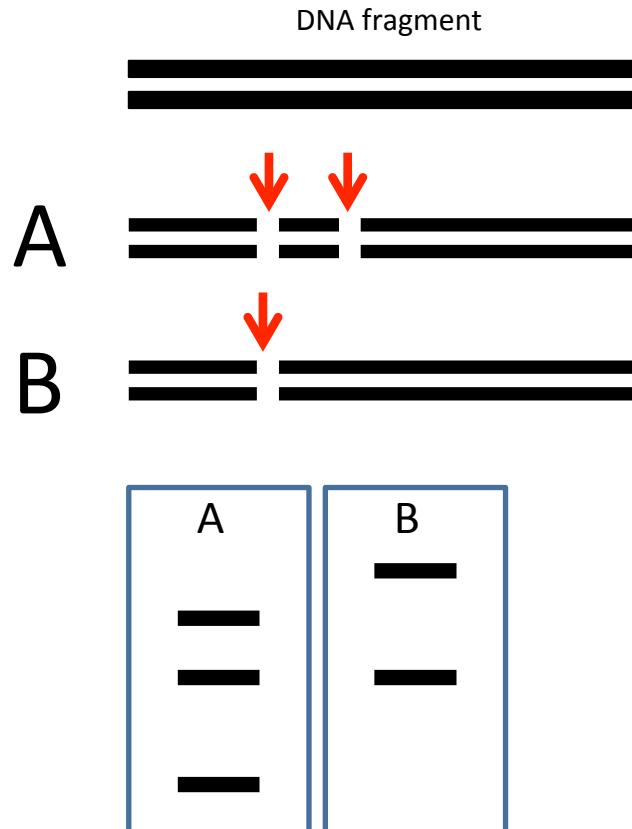
Alec Jeffreys, early '80



Principio base:

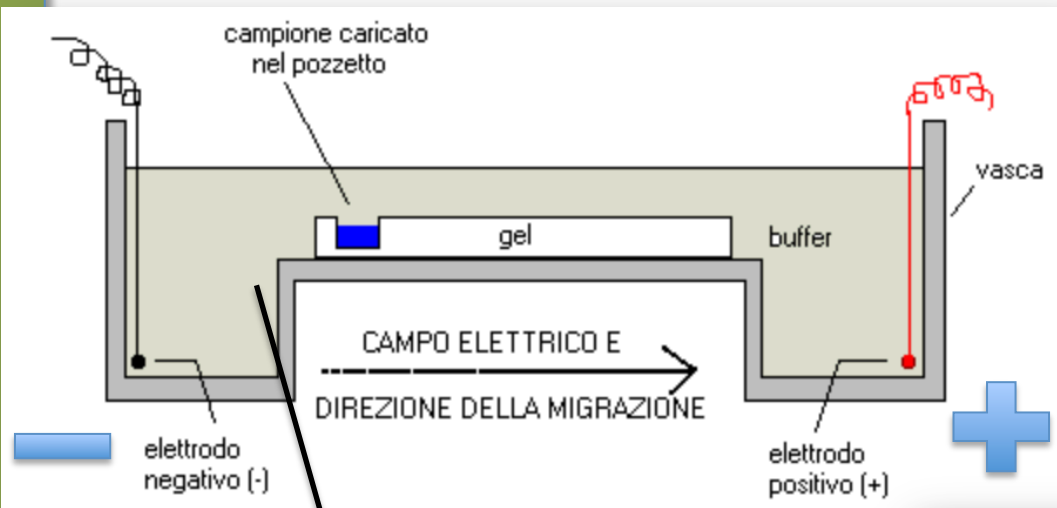
Digestione del DNA con **ENZIMI DI RESTRIZIONE**

I frammenti risultanti sono visualizzati mediante corsa elettroforetica



(...) – ELETTROFORESI

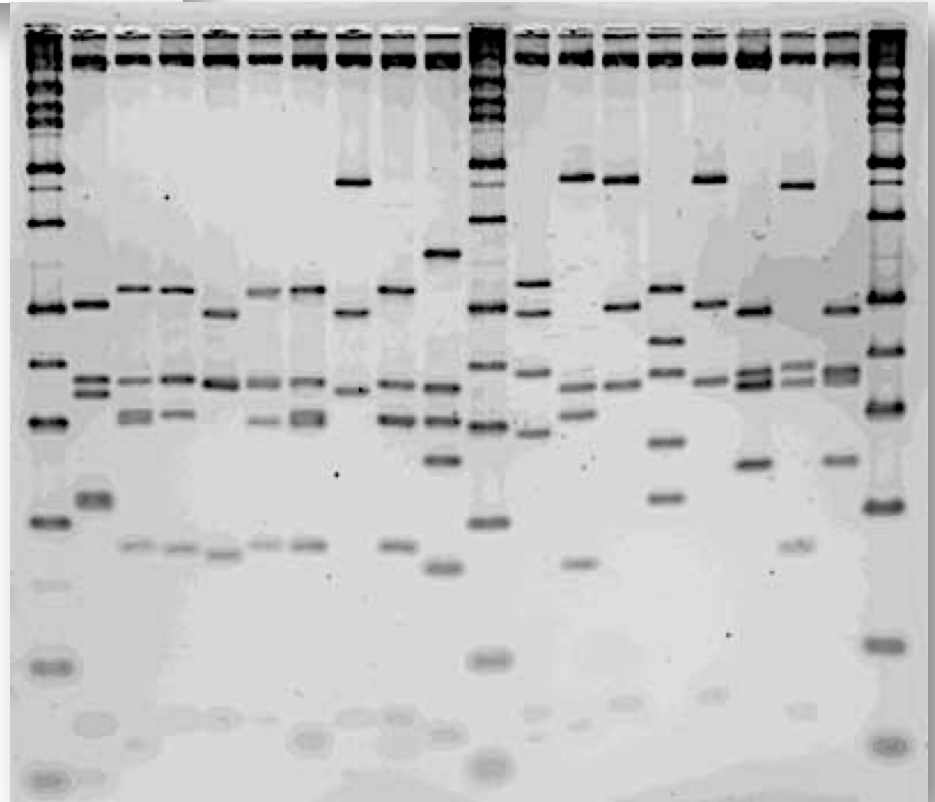
Migrazione su matrice porosa di molecole acide (cariche negativamente) sfruttando un campo elettrico



Tampone di corsa
Soluzione salina a bassa forza ionica



Garantisce la
conduzione uniforme e
regolare della corrente



RFLP

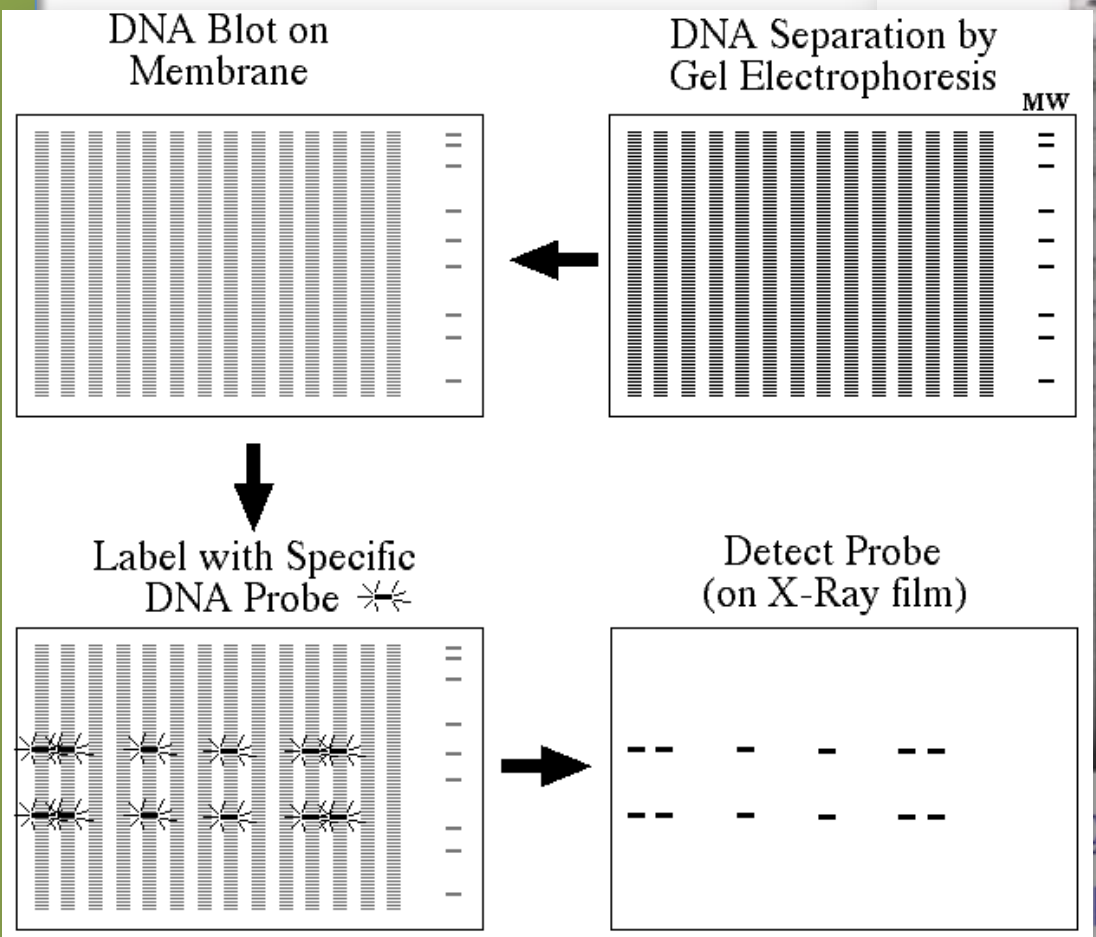
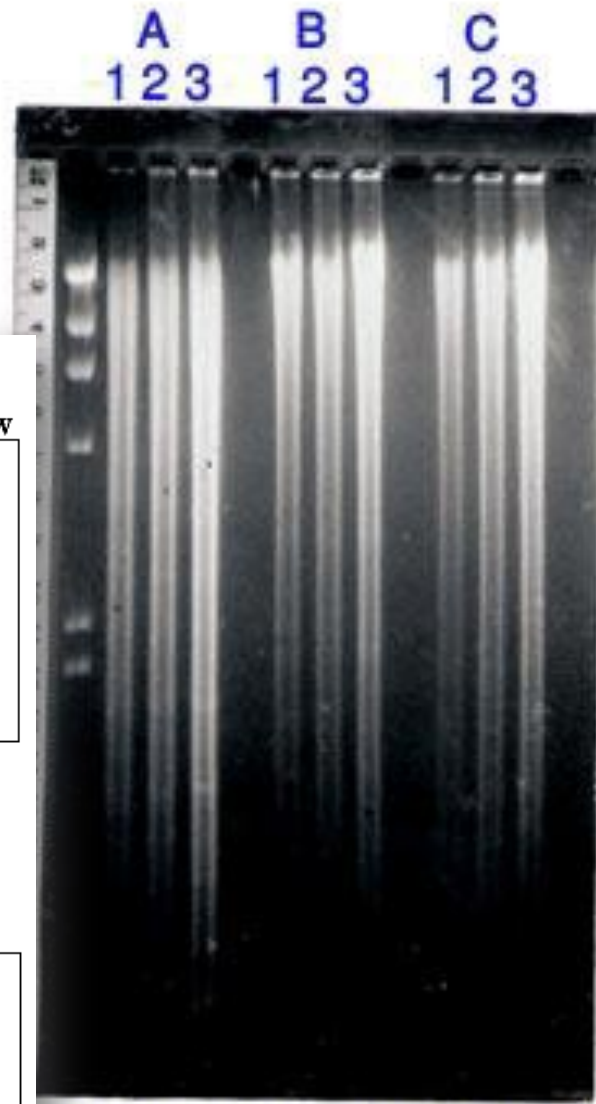


Svantaggi:

- **Poco informativo** nel caso di mutazioni intraspecifiche
- **Se applicato su intero genoma non da risultati visibili**
- Deve essere associato a ibridazione se applicato a interi genomi (time-consuming) o applicato a frammenti corti per un risultato immediato (PCR – informazione a priori)

RFLP

Digestione di interi genomi produce **smears**

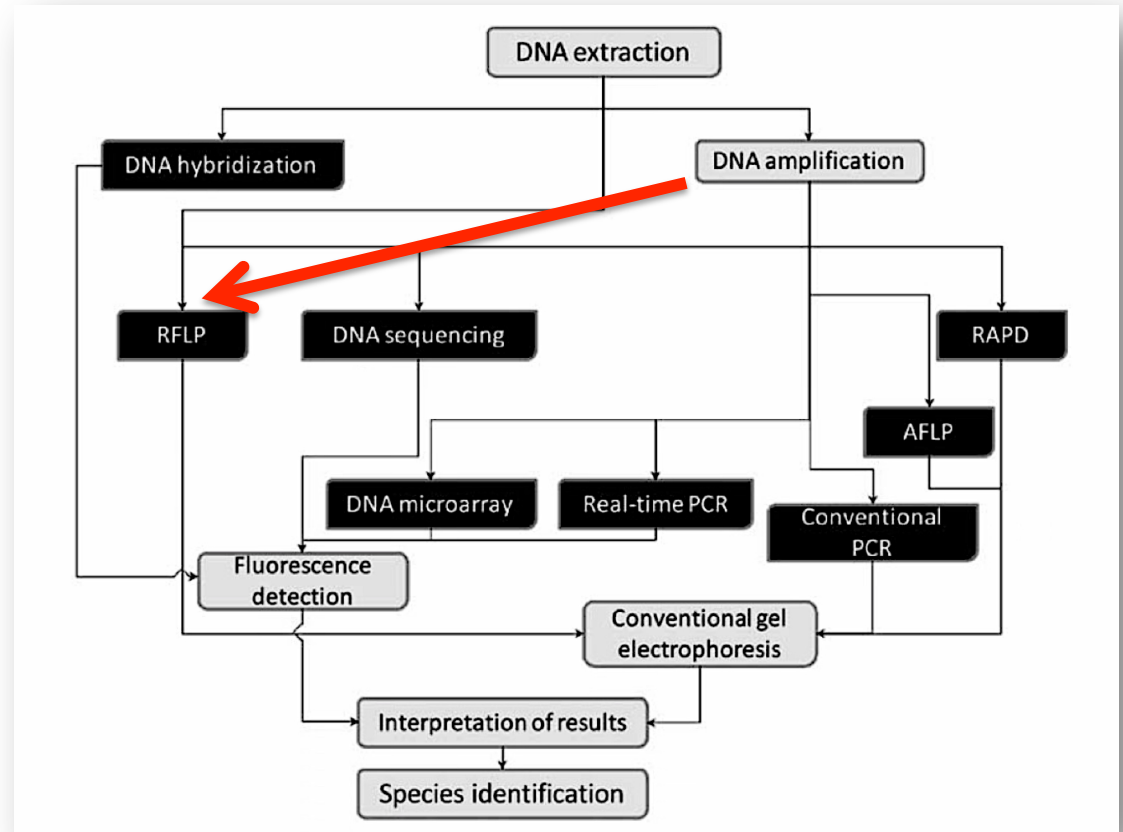


gested with restricted enzymes
Bam HI , Eco RI , C= Hpa I

RFLP

Per ovviare a questo problema e semplificare il metodo . . .

Si parte dalla
RESTRIZIONE di
FRAMMENTI DI
PCR



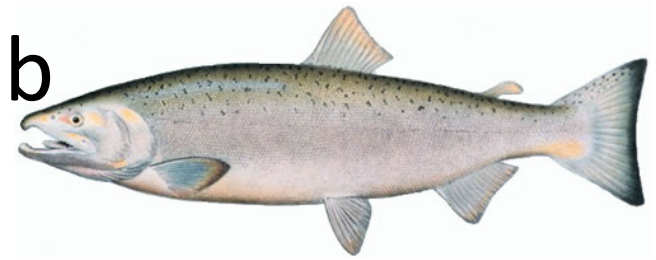
RFLP

a

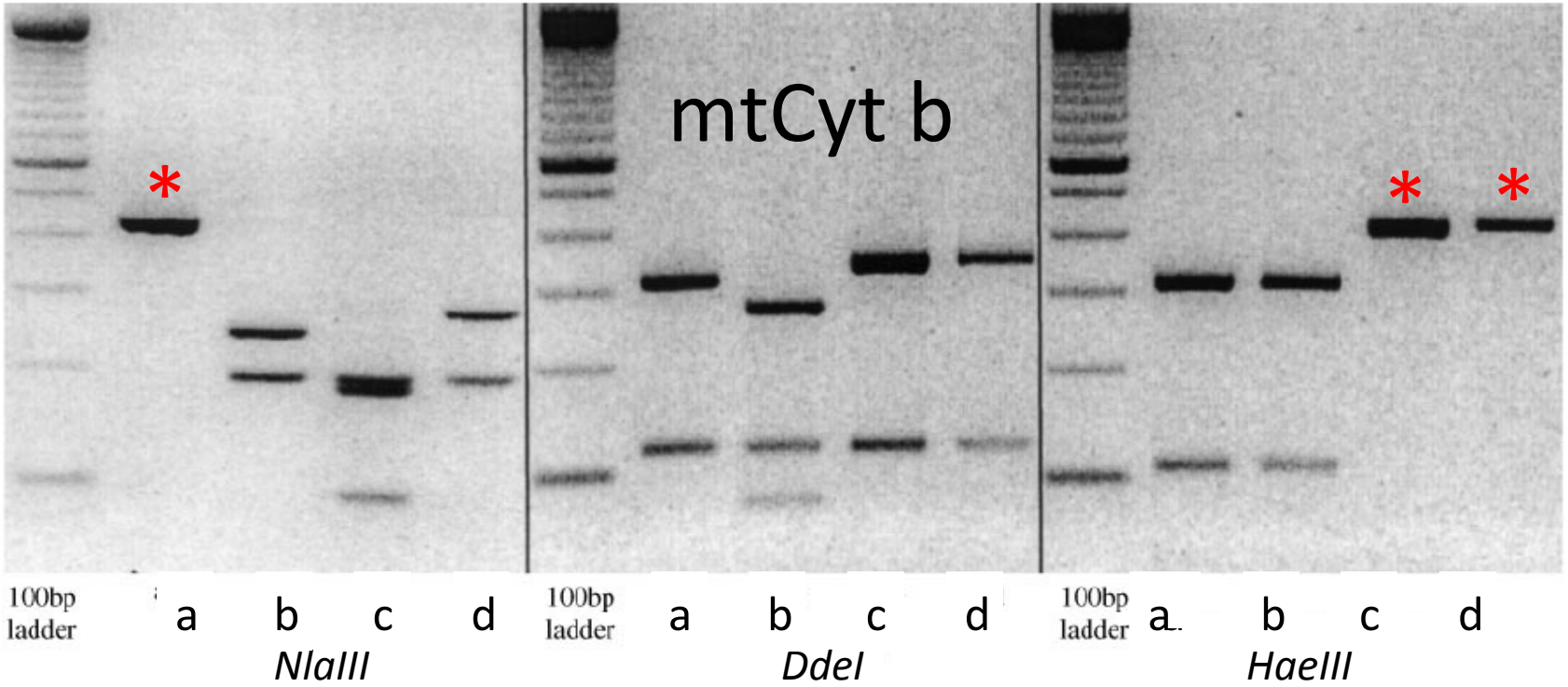


Atlantic salmon (*Salmo salar*)

b



Silver salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

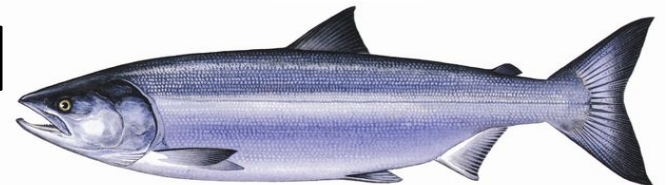


c



Pink salmon (*O. gorbuscha*)

d



Chum salmon (*Oncorhynchus keta*)

Species Identification and PCR-RFLP
Analysis of Cytochrome *b* Gene in Cod
Fish (Order *Gadiformes*) Products

Case study

- **Cod Fish (Merluzzo)** is one of the most important commercial fish in Japan.
- 3 genera of cod fish (*Gadus*, *Theragra* and *Merluccius*) exist and are imported following restricted import quotas.
- **9 cod fish imported into Japan as “cod fish”.**
- Their commercialized products are difficult to identify.

➤ **Trade control**

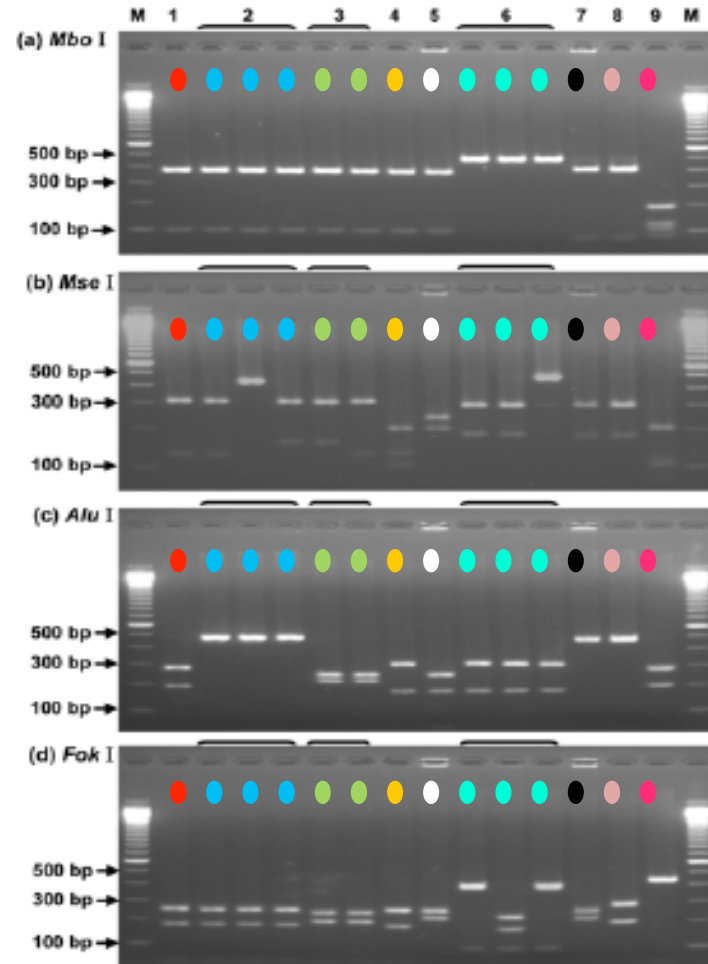
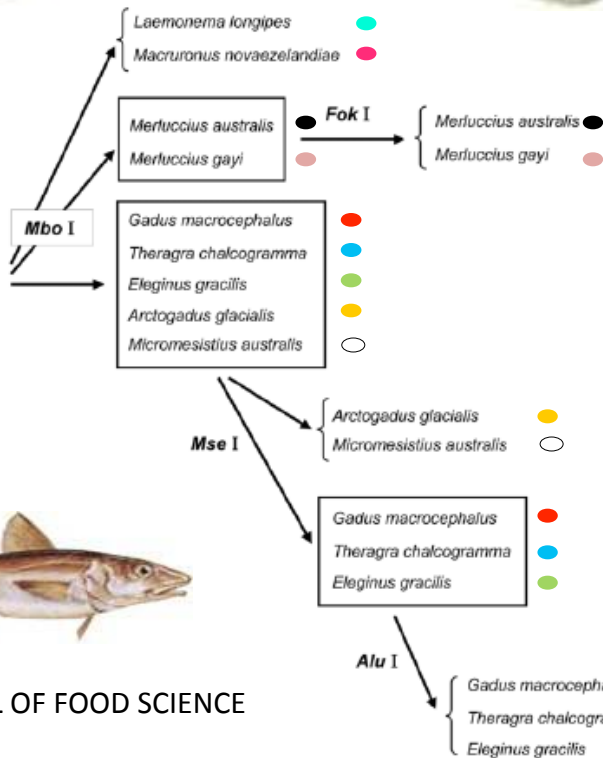
➤ **Sicurezza dei consumatori**

➤ **Smuggling**

Species Identification and PCR-RFLP Analysis of Cytochrome *b* Gene in Cod Fish (Order *Gadiformes*) Products



- *Gadus macrocephalus*
- *Theragra chalcogramma*
- *Eleginus gracilis*
- *Arctogadus glacialis*
- *Micromesistius australis*
- *Merluccius australis*
- *Merluccius gayi*
- *Laemonema longipes*
- *Macruronus novaezelandiae*



AKASAKI et al. JOURNAL OF FOOD SCIENCE
Vol. 71, Nr. 3, 2006



RFLP



Svantaggi:

- **Poco informativo** nel caso di mutazioni intraspecifiche
- Richiede DNA di buona qualità
- **Se applicato su intero genoma non da risultati visibili**
- Deve essere associato a ibridazione se applicato a interi genomi (time-consuming) o applicato a frammenti corti per un risultato immediato (PCR – informazione a priori)
- **Informazione a priori**
- Costoso se devo usare tanti enzimi



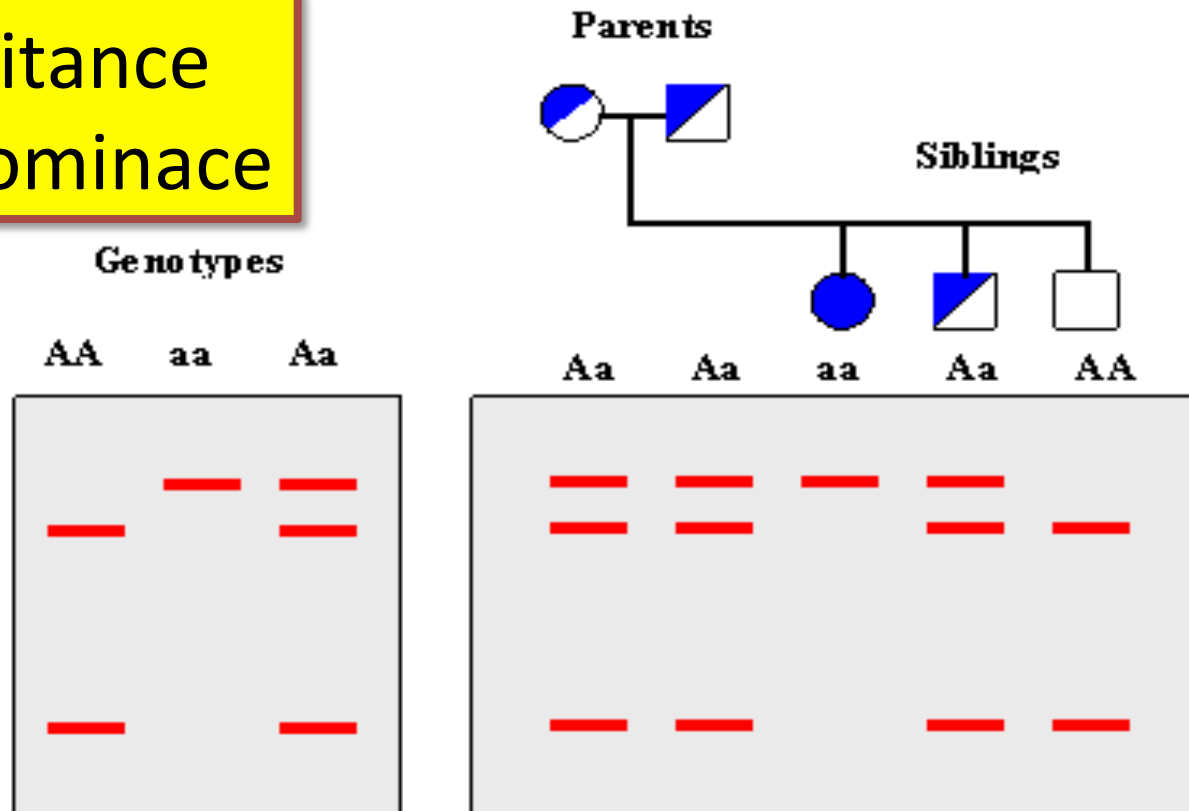
Vantaggi:

- **Codominante**
- **Eredità mendeliana**
- Riproducibile
- Poco costoso

RFLP

Suitable as starting point for the
DNA fingerprinting


Inheritance
Co-dominance



E' uno dei primi marcatori basati su DNA applicati
a metà degli anni '80 in casi di indagine forense

RFLP

1° evidenza dell'utilità delle analisi genetiche nei casi penali e di identificazione personale

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



Colin Pitchfork

Consenso al prelievo

Fortuna!

Disponibilità di campioni freschi e ben conservati

RFLP e DNA fingerprinting

Il caso di OJ Simpson

Famoso giocatore di football
accusato di aver ucciso l'ex
moglie e il compagno



Match inconfutabile con il test del DNA fingerprinting

MA . . .

**La difesa vince grazie all'accusa di cross-contaminazione
del materiale biologico dovuta alla poca esperienza del
corpo di polizia nelle procedure di repertazione**

Reperti sporchi di sangue, ancora umidi, lasciati in macchina al sole per diverse ore.
Causa possibile (anche se non apparente) degradazione del DNA, le prove genetiche non
sono state determinanti.

RFLP e DNA fingerprinting

Come faccio a determinare la corrispondenza di un profilo con un altro??

... E a dare a questa prova valore provatorio e affidabilità???

RFLP e DNA fingerprinting

Analisi del DNA per
l'identificazione
individuale

**CONFRONTO di
PROFILI GENETICI**



Il peso di una **corrispondenza (match)** tra un profilo di Dna Q ed il profilo del sospettato K è **QUANTIFICATO** in termini di **probabilità**

Qual è la probabilità che un profilo come quello creato a partire dal materiale biologico rinvenuto corrisponda al profilo genetico di un individuo scelto a caso dalla popolazione?

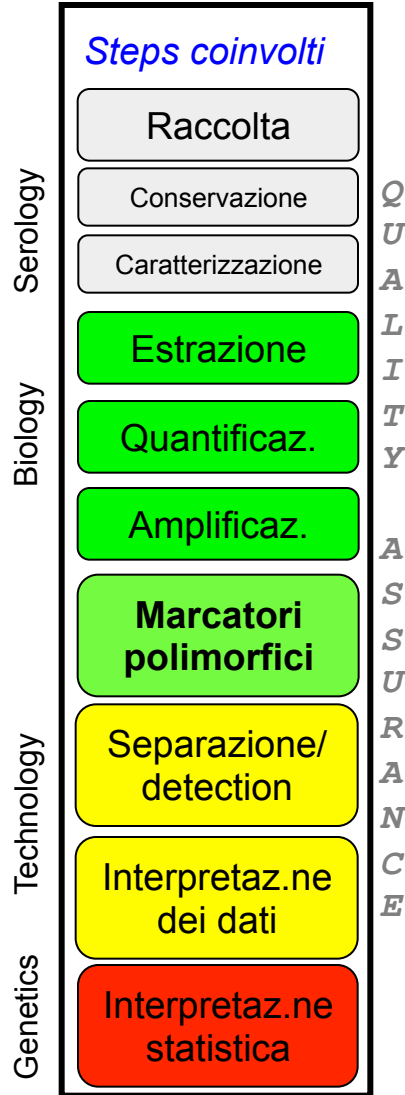
**Ereditarietà Mendeliana
Co-dominanza**



Crimine

Trasferimento del materiale biologico

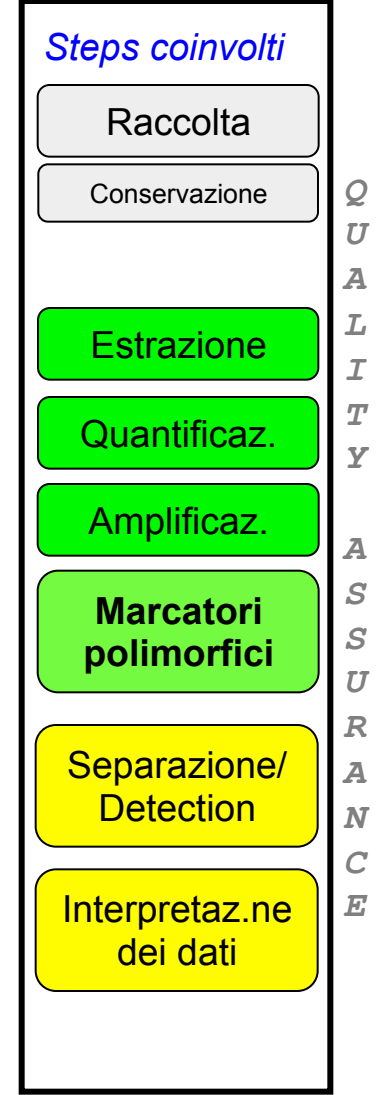
Campione
"Q" (Question)



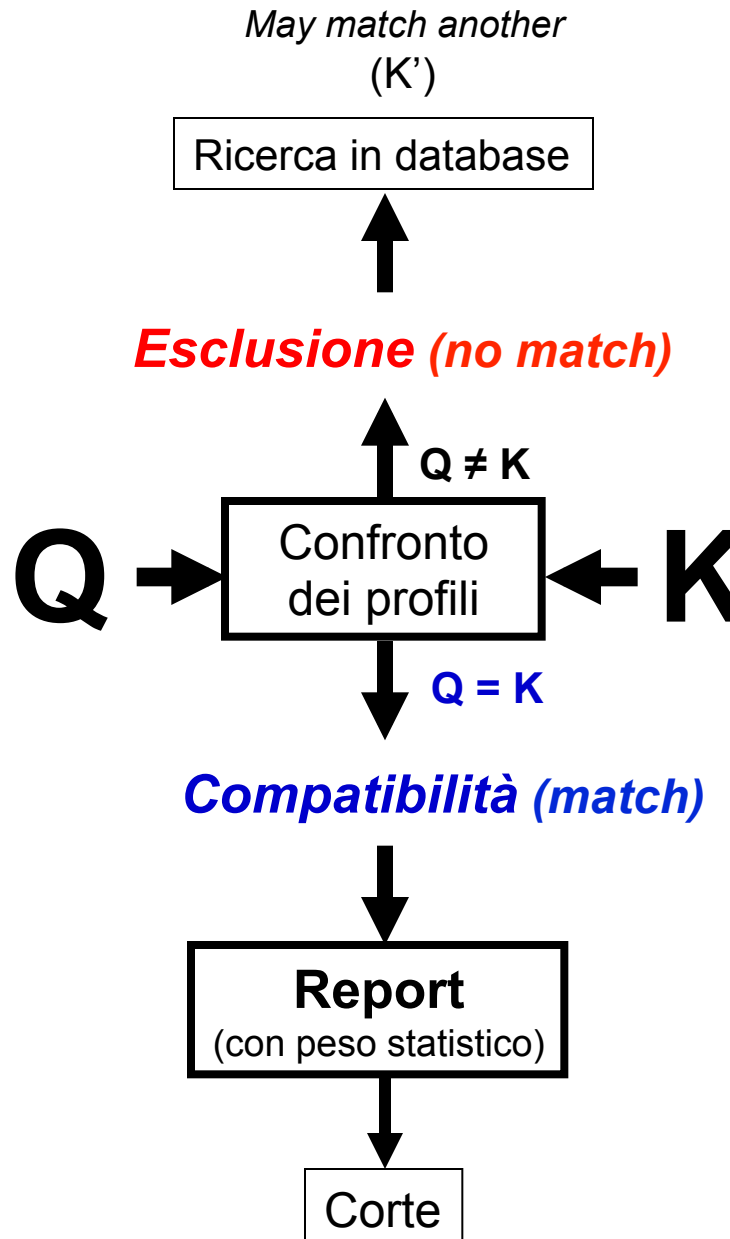
Profilo depositato in database

Sospettato individuato

Reference
campione "K" (Known)



Profilo depositato in database



**Parentesi su alcuni
concetti base sulla
Genetica delle
Popolazioni**

CO-DOMINANZA

Alleli “Presenza” e “Assenza” visibili in tutti gli stati

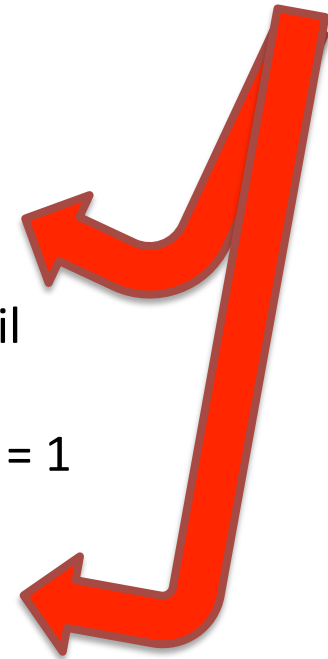
- ✓ E' possibile distinguere un individuo omozigote per l'allele “Presenza” (PP) da un eterozigote “Presenza/Assenza” (PA) e da un omozigote “Assenza/Assenza” (AA).

Stime delle FREQUENZE GENOTIPICHE

- Rapporto tra il n. di individui con un dato genotipo e il totale degli individui
- Somma di tutte le frequenze genotipiche ad un locus = 1

Stime delle FREQUENZE ALLELICHE

- Rapporto tra il n. di COPIE di quell'allele nella popolazione e il n. totale di alleli presenti a quel locus nella popolazione
- Somma di tutte le frequenze alleliche ad un locus = 1



CO-DOMINANZA

Un allele è una variazione ad un locus

Allele1: CCGCTACGTACACGCTG

Allele2: CCGCTACGTATACGCTG

Esempio: popolazione di 1000 individui $2n$

350 omozigoti CC - 500 eterozigoti CT - 150 omozigoti TT

Frequenze
genotipiche:

$$f(CC) = 350/1000 = 0,35$$

$$f(CT) = 500/1000 = 0,5$$

$$f(TT) = 150/1000 = 0,15$$

Frequenze
allelliche:

p

$$f(C) = [(350 \times 2) + 500]/(1000 \times 2) = 0,6$$

q

$$f(T) = [(150 \times 2) + 500]/(1000 \times 2) = 0,4$$

Legge di Equilibrio di Hardy-Weinberg (HEW)

In una popolazione **INFINITAMENTE** grande e ad **ACCOPPIAMENTO CASUALE (PANMITTICA)**, sulla quale **NON** agiscono **FORZE EVOLUTIVE** (mutazioni, migrazioni, selezione naturale, ecc), ad ogni locus le frequenze alleliche non variano con il tempo e le frequenze genotipiche si stabilizzano in una generazione in modo che

$$f(AA) = p^2$$

$$f(aa) = q^2$$

$$f(Aa) = 2pq$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$(p+q)^2 = 1$$

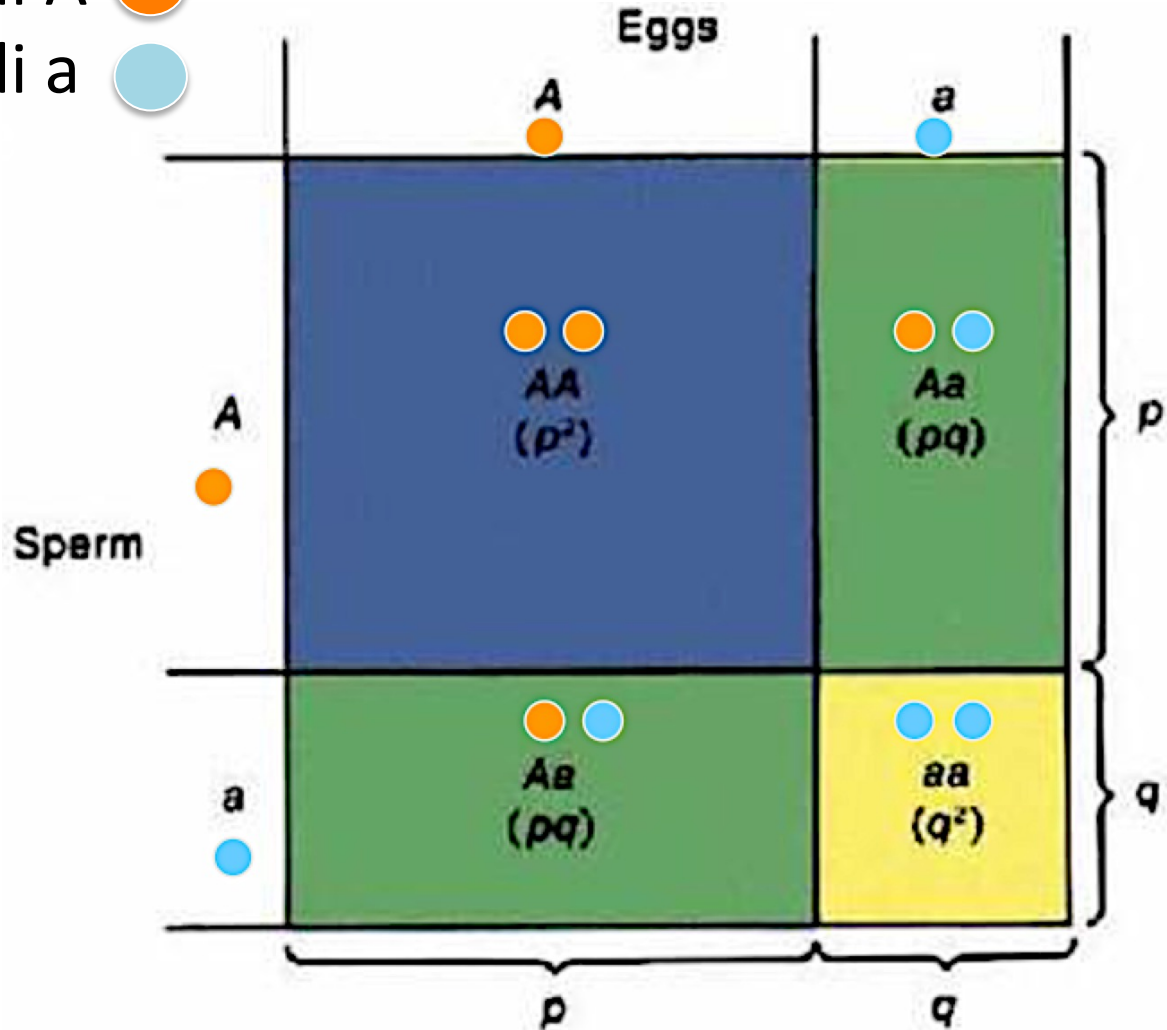
Legge di Equilibrio di Hardy-Weinberg (HEW)

Se p è la frequenza di A ●
Se q è la frequenza di a ●

●● = p^2
 AA

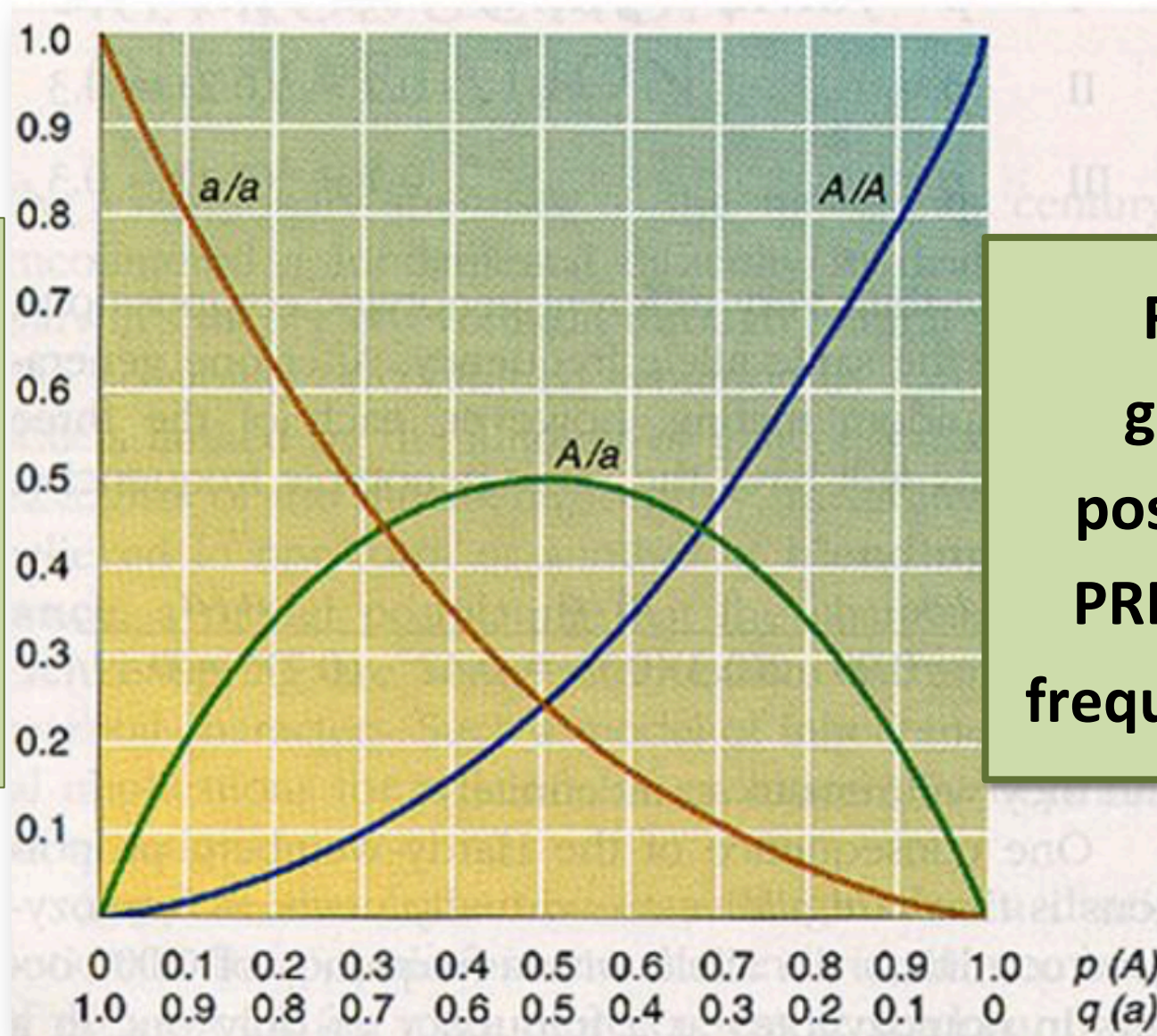
●● = q^2
 aa

●● = $2pq$
 Aa



Legge di Equilibrio di Hardy-Weinberg (HEW)

Frequenze genotipiche

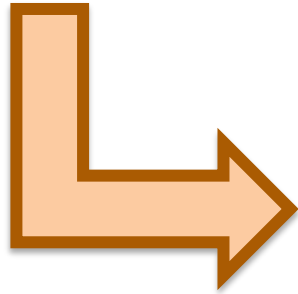


Frequenze genotipiche possono essere **PREDETTE** dalle frequenze alleliche

Frequenze alleliche

Random match probability (RMP)

Probabilità che un individuo NON imparentato con il sospettato, preso a caso nella popolazione, abbia lo stesso genotipo



**Viene valutata la diffusione
(frequenza) di quel genotipo
nella popolazione**

Teorema della PROBABILITA' COMOPSTA o del PRODOTTO:

Dati due o più eventi, la probabilità che si verifichino contemporaneamente è data dal prodotto della probabilità di uno di essi per la probabilità condizionata dell'altro.



**Dipende se sono eventi
DIPENDENTI o INDIPENDENTI**

Random match probability (RMP)

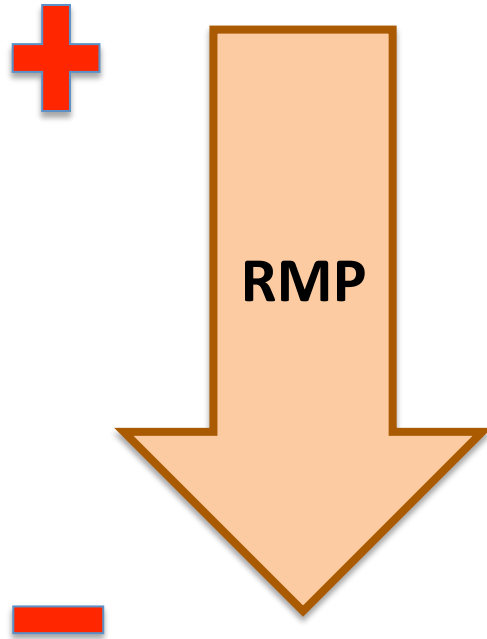
Ottenute da Database di Frequenze



Locus	Alleli	Frequenze alleliche (p;q)	Frequenza genotipica	
			Formula	Valore
D8S1179	10 13	0,084700 0,301500	$2pq$	0,0510741
D21S11	30 30	0,233640 0,233640	p^2	0,05458765
D7S820	10 10	0,274948 0,274948	p^2	0,075596403
CSF1PO	10 12	0,242076 0,328067	$2pq$	0,158834294

Frequenza del profilo (RMP) = $3,348 \times 10^{-5}$

Random match probability (RMP)



- Quanti più loci NON IN LINKAGE vengono analizzati nel profilo
- Quanto più i loci sono variabili

Esempio:

Considerando 13 loci CODIS si ottiene **un valore medio per individui non imparentati di 1 su 1.000.000.000.000 (10^{12})**, anche in popolazioni con ridotta variabilità (Apaches).


Considerando che la popolazione mondiale conta meno di 7×10^9 individui, l'affidabilità del dato genetico in caso di match è praticamente certa.

Likelihood Ratio test (LR)

Confronto delle probabilità di osservare un particolare evento (il profilo genetico) sotto due ipotesi mutuamente esclusive:

H_p: il DNA sulla scena del crimine è del sospettato

H_d: il DNA sulla scena del crimine appartiene a terzi con lo stesso profilo genetico

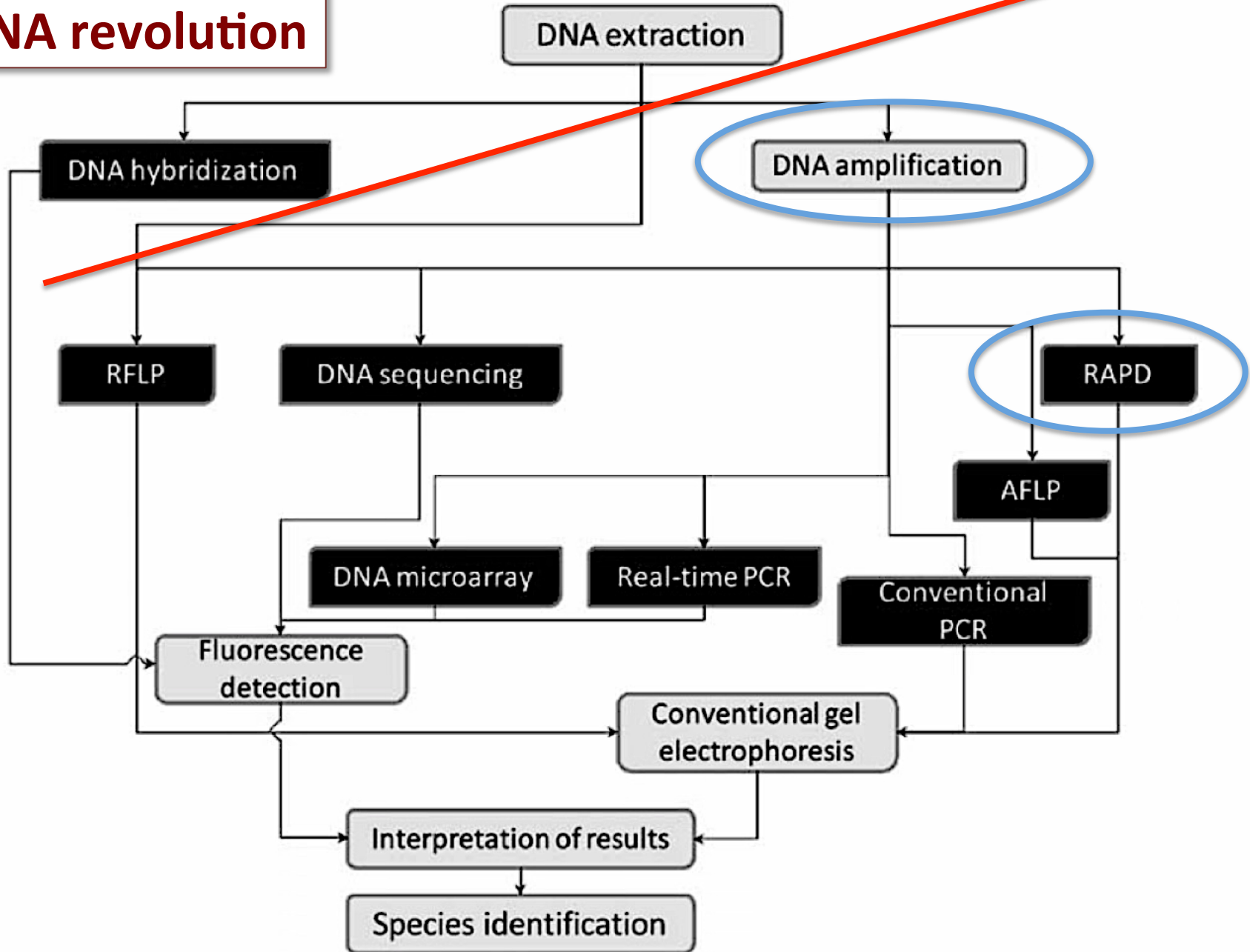
$$LR = \frac{H_p}{H_d} = \frac{1}{RMP}$$


**Rapporto di
VEROSIMIGLIANZA**

Frequenza del profilo nella popolazione

LR > 1 Il profilo è compatibile con l'accusato
Con 13 loci CODIS si ottengono in media valori
di **LR superiori a 10¹⁷**

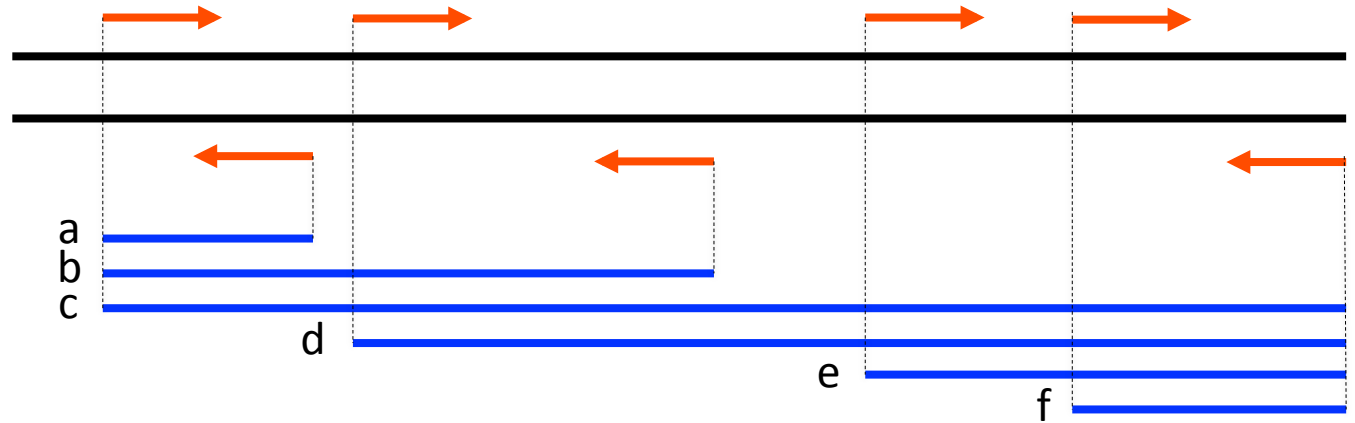
DNA revolution



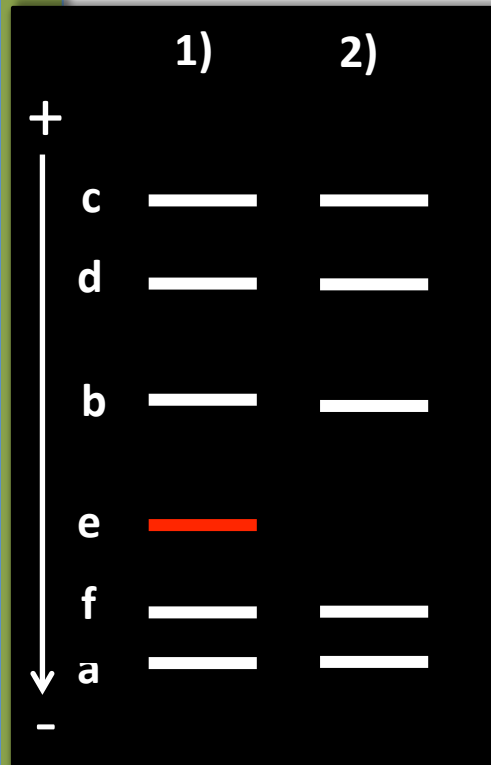
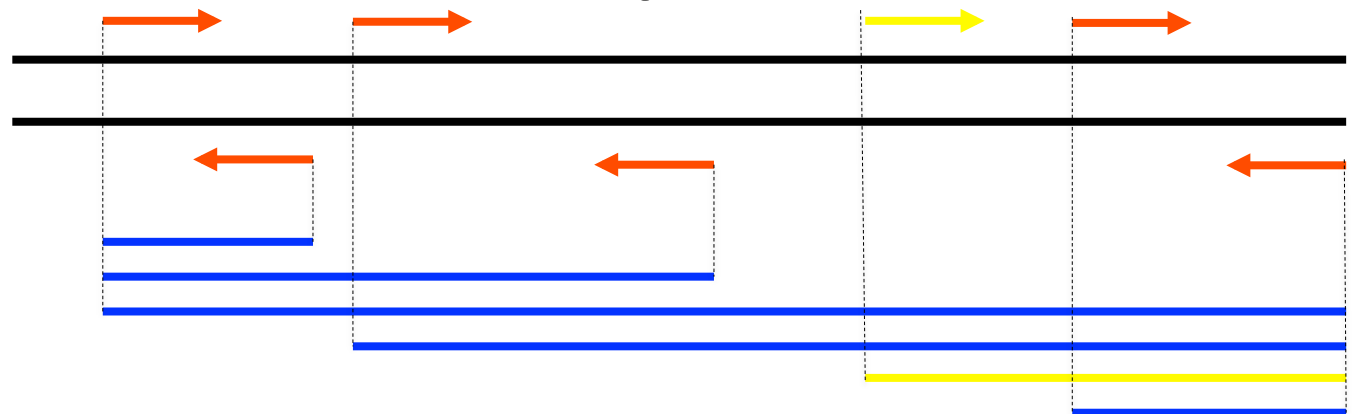
RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*

Principio base: PCR con RANDOM PRIMERS

1)



2)



RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*

Vantaggi:

- Elevato numero di marcatori indipendenti (è possibile incrementarli al variare dei “random primers”)
- Nessuna informazione a priori richiesta
- Possibilità di isolare loci singoli
- **Utilizzata per screening genomici**
- Facile, veloce, economica



Svantaggi:

- Poco riproducibile
- Forte assunzione di omologia delle bande co-migrate nel gel
- **DOMINANTE**



DOMINANZA

L'allele "Presenza" maschera l'allele "Assenza"

- ✓ Non è possibile distinguere un individuo omozigote per l'allele "Presenza" (PP) da un eterozigote "Presenza/Assenza" (PA).
- ✓ L'unico genotipo distinguibile in modo certo è l'omozigote per l'allele "Assenza" (AA)

**Non è possibile stimare le
FREQUENZE ALLELICHE**

Posso solo stimare la
frequenza (q) di A e dedurre
la frequenza di P (p),
ASSUMENDO EHW

$$f(AA) = q^2 \rightarrow f(A) = \sqrt{q} \rightarrow p = 1 - q$$

Problema per
l'applicazione nelle
scienze forensi dove il
calcolo probabilistico è
basato anche sulla
stima delle frequenze

RAPD

Applicazione in Studi demografici

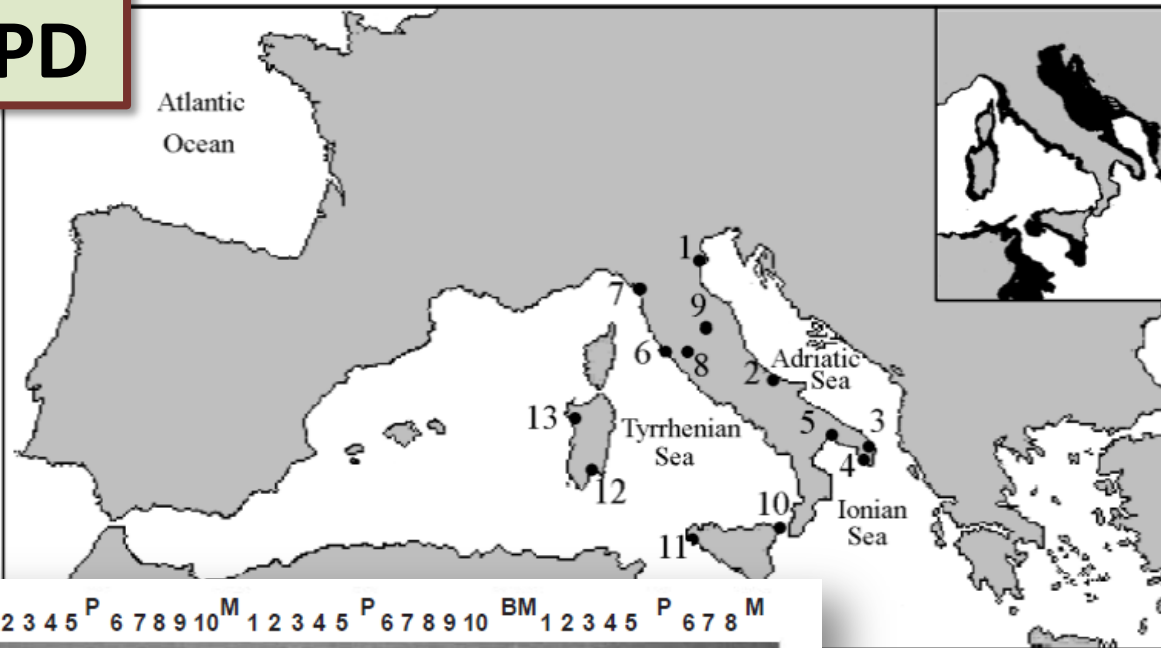
**Population analysis of the sand smelt
Atherina boyeri (Teleostei Atherinidae),
from Italian coastal lagoons by random
amplified polymorphic DNA**

Vol. 229: 279–289, 2002

MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES
Mar Ecol Prog Ser

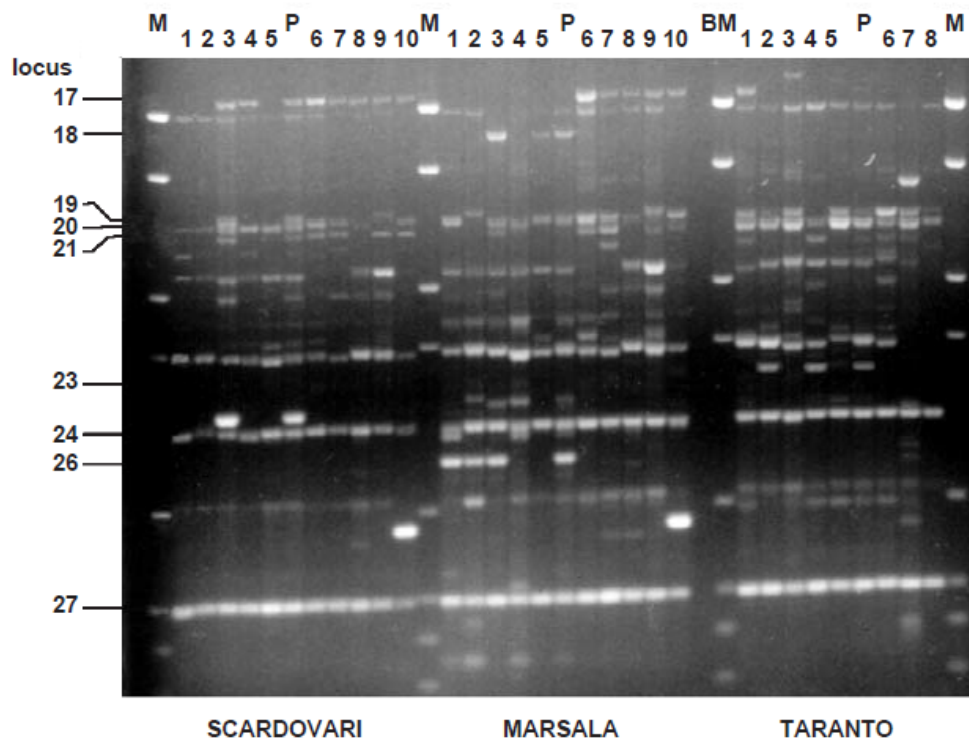


RAPD



Possibilità di applicazione diretta a interi genomi

Fig. 1. *Atherina boyeri*. Map of the sampling sites for populations: Scardovari (1), Lesina (2), Acquatina (3), Ugento (4), Taranto (5), Orbetello (6), Massaciucoli (7), Bolsena Lake (8), Trasimeno Lake (9), Faro (10), Marsala (11), Cagliari (12) and Alghero (13). The inset shows the land extension during the last glaciation (18 000 years ago)



Campionamento



RAPD + elettroforesi



Stima frequenze alleliche

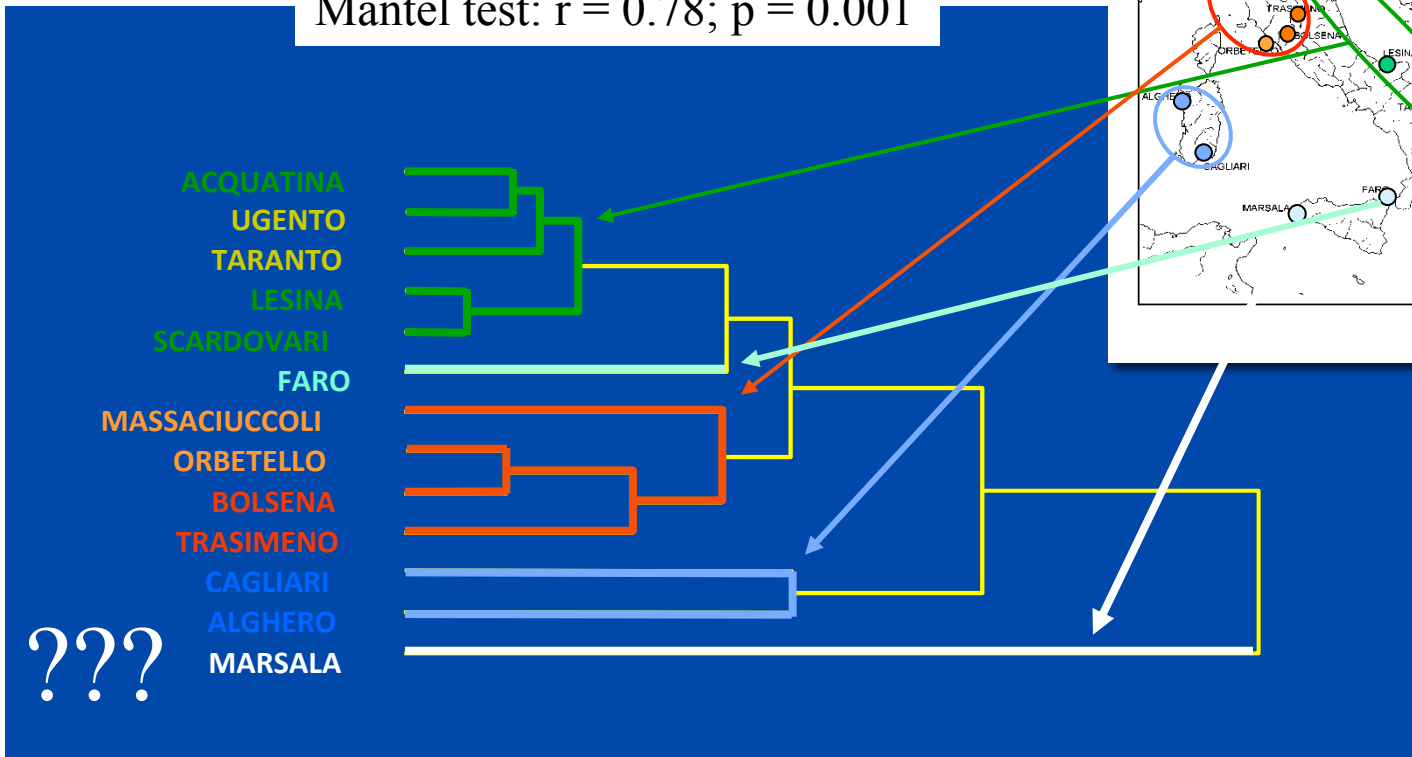


Analisi di connettività tra popolazioni

RAPD

$F_{st} = 0.32$ ($P < 0.0001$)
(genetic structure)

Mantel test: $r = 0.78$; $p = 0.001$



- ✓ Correlazione positiva tra distanza genetica e distanza geografica
- ✓ La popolazione di marsala viene clusterizzata come “outgroup”
- ✓ Possibilità di identificare la provenienza degli individui

Applicazione nella TRACCIABILITA'

RAPD

Un esempio dal nostro laboratorio:
Identificazione di specie in individui destinati al commercio



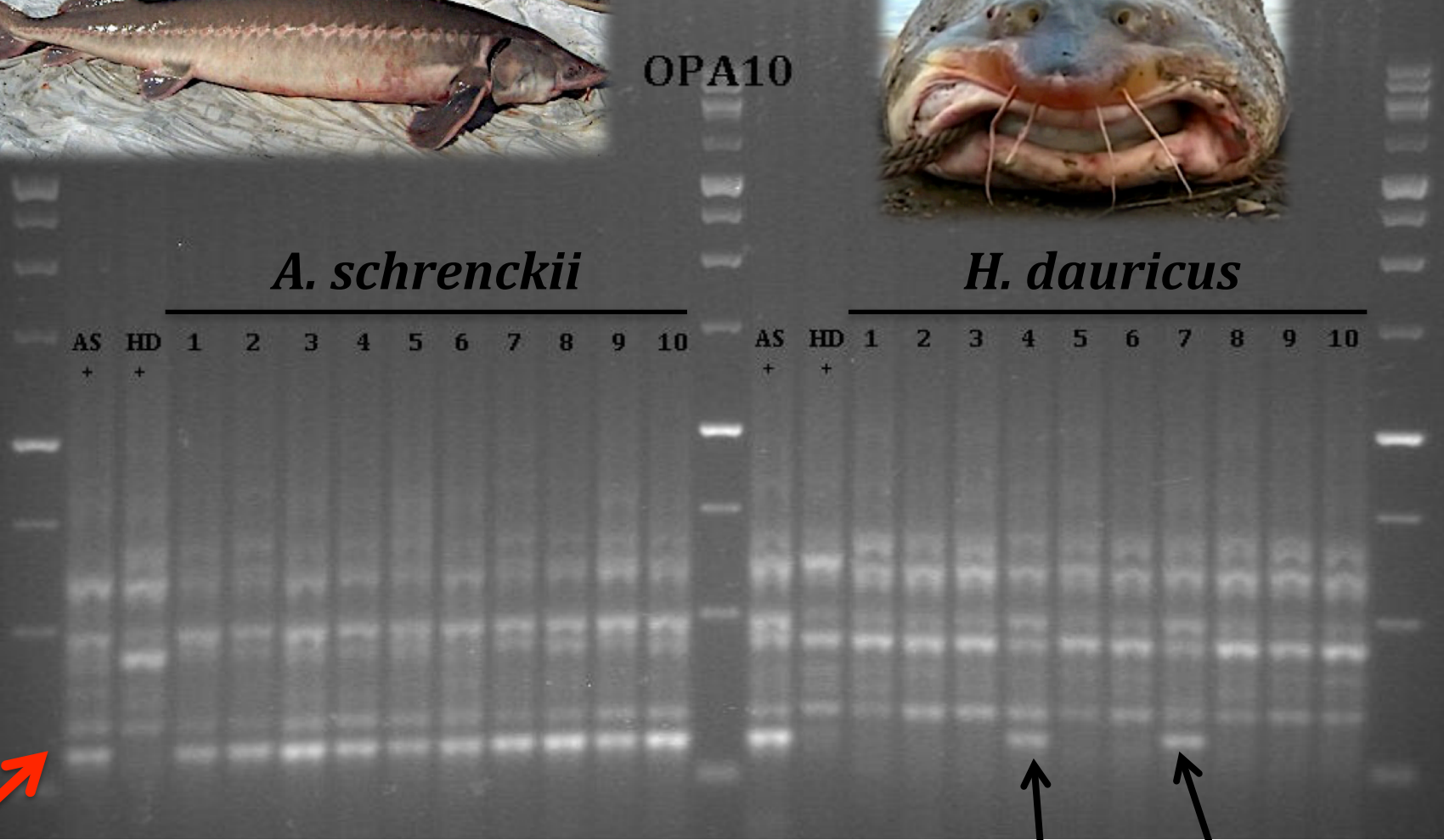
OPA10

A. schrenckii

H. dauricus

AS HD 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
+ +

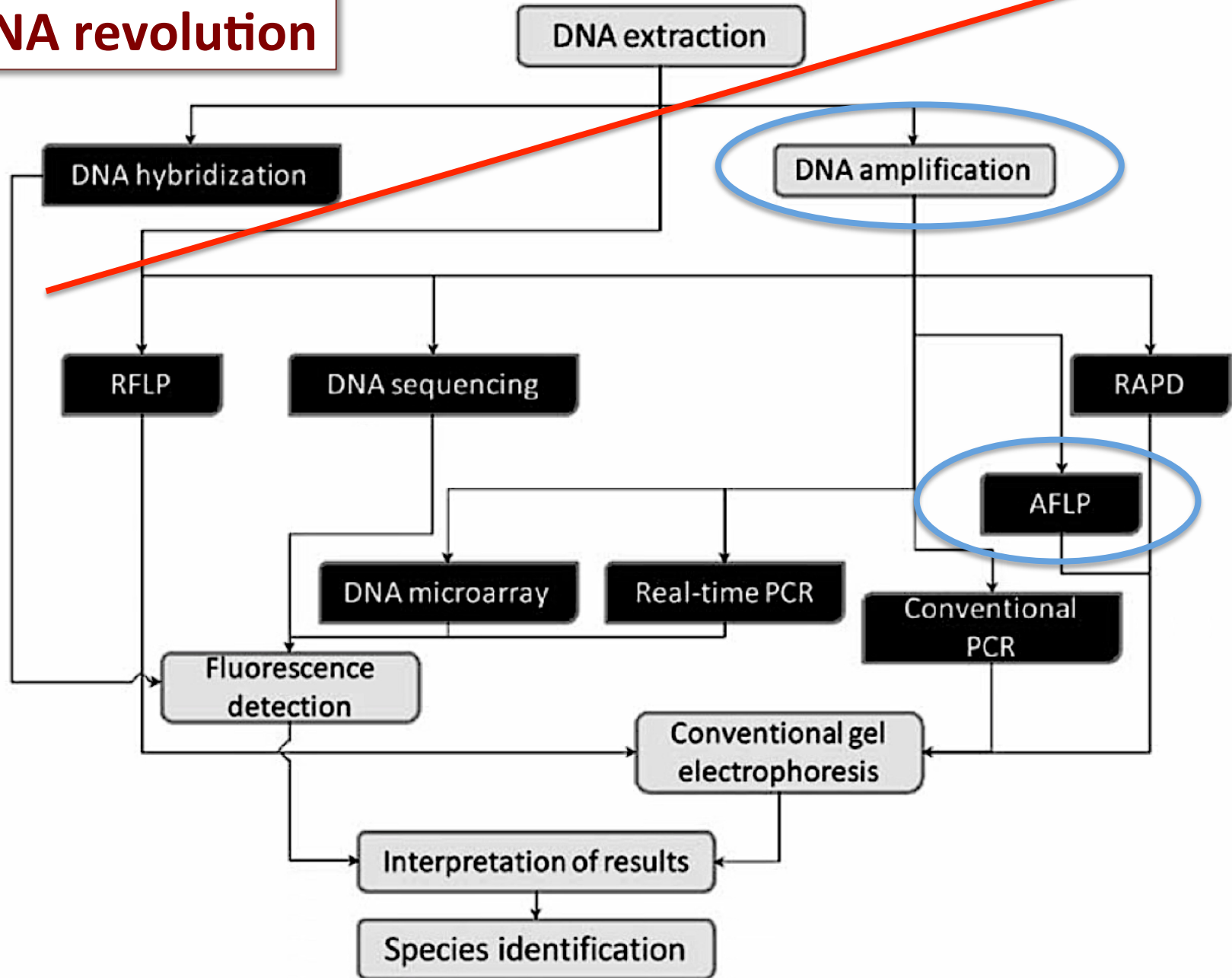
AS HD 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
+ +



Hybrids



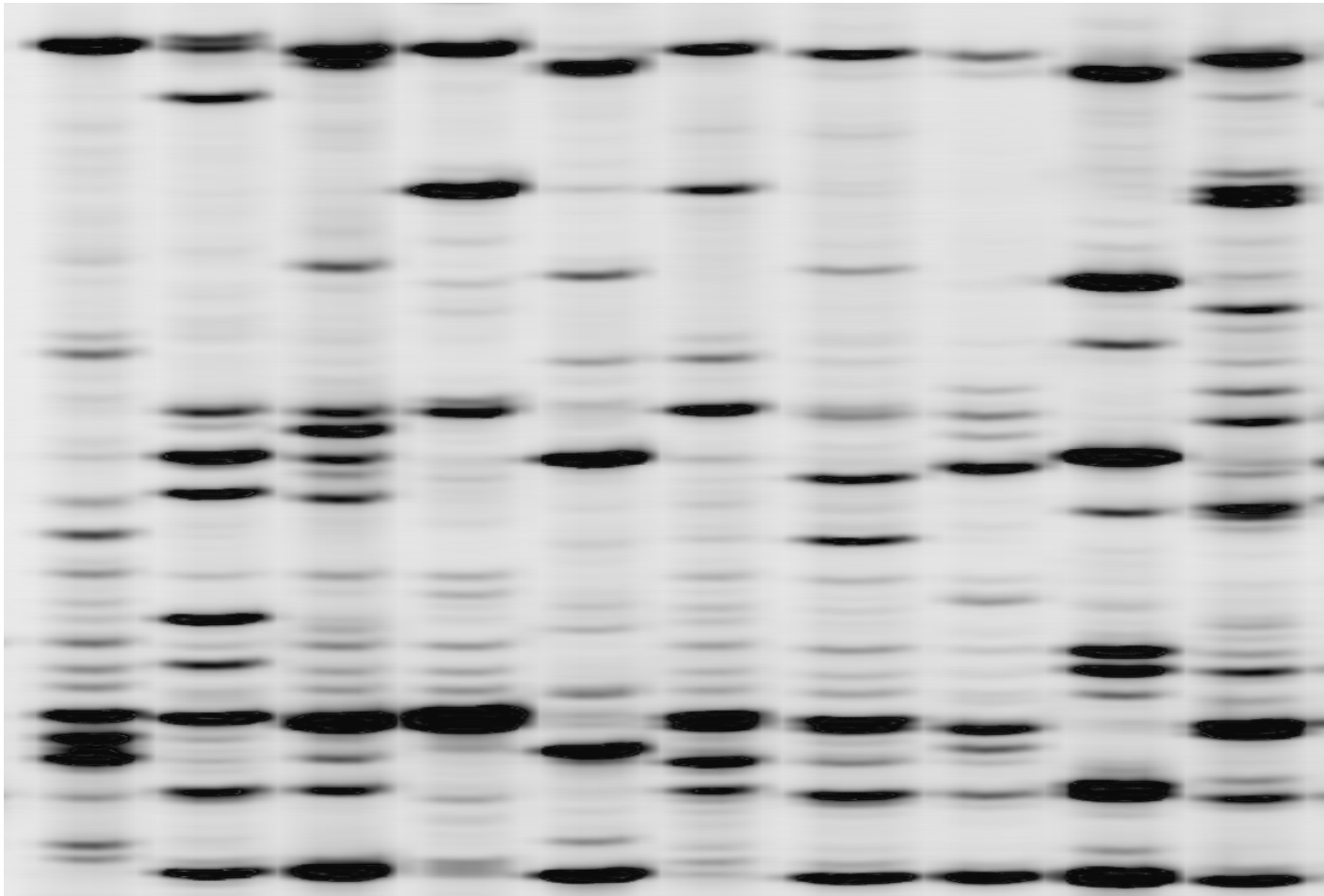
DNA revolution



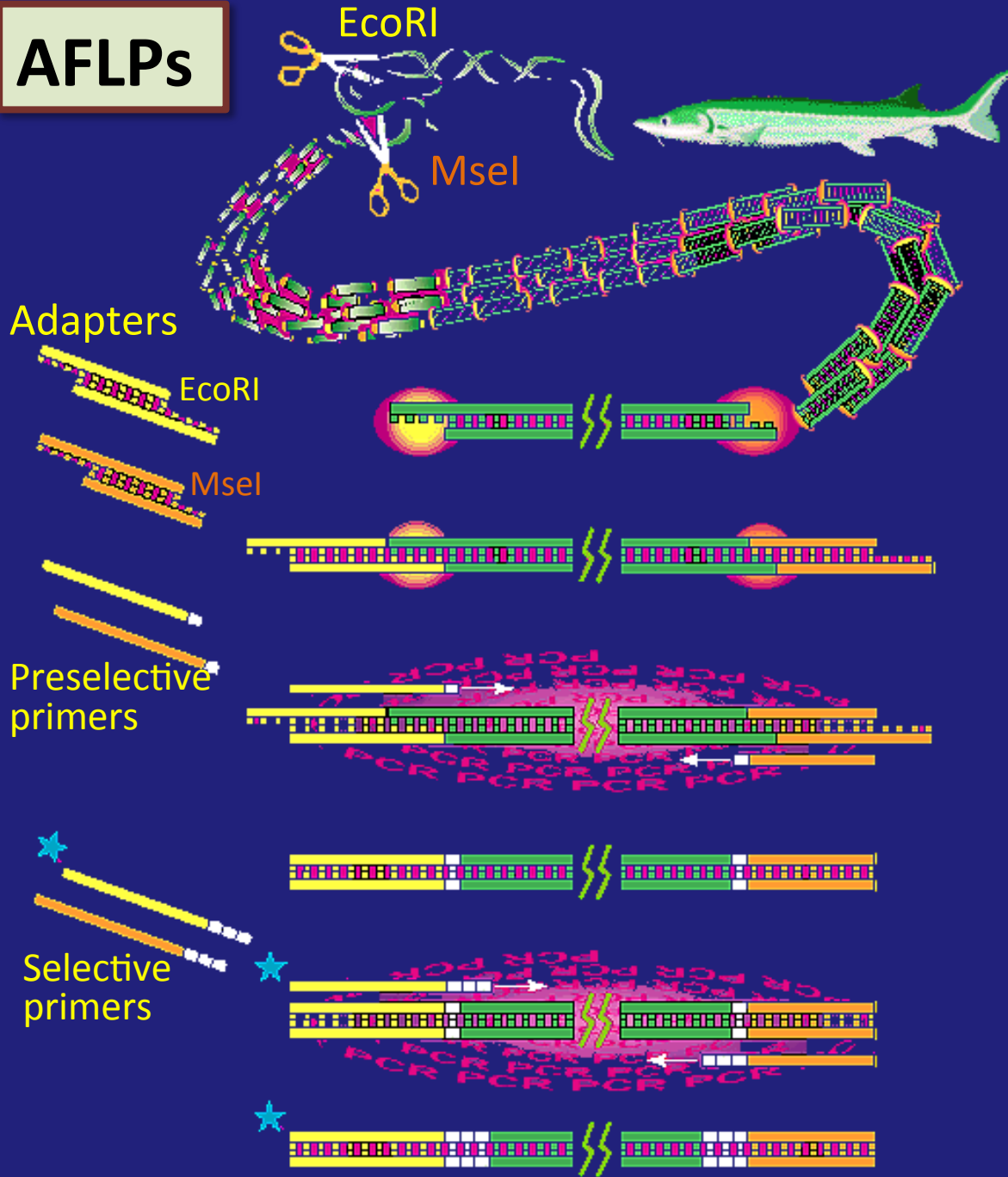
AFLPs – Amplified Fragments Length Polymorphisms

Principio base:

Amplificazione **SELETTIVA** di frammenti di restrizione
Materiale di partenza **INTERO GENOMA**



AFLPs

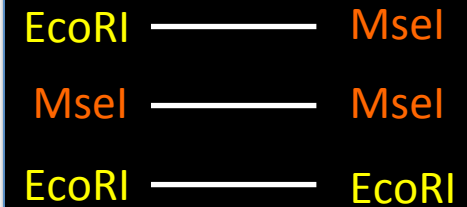


Taglio enzimatico:

- Pool di Frammenti di restrizione con estremità a singolo filamento

Ligazione:

- 2 tipologie di adattatori adattatori
- Pool di frammenti



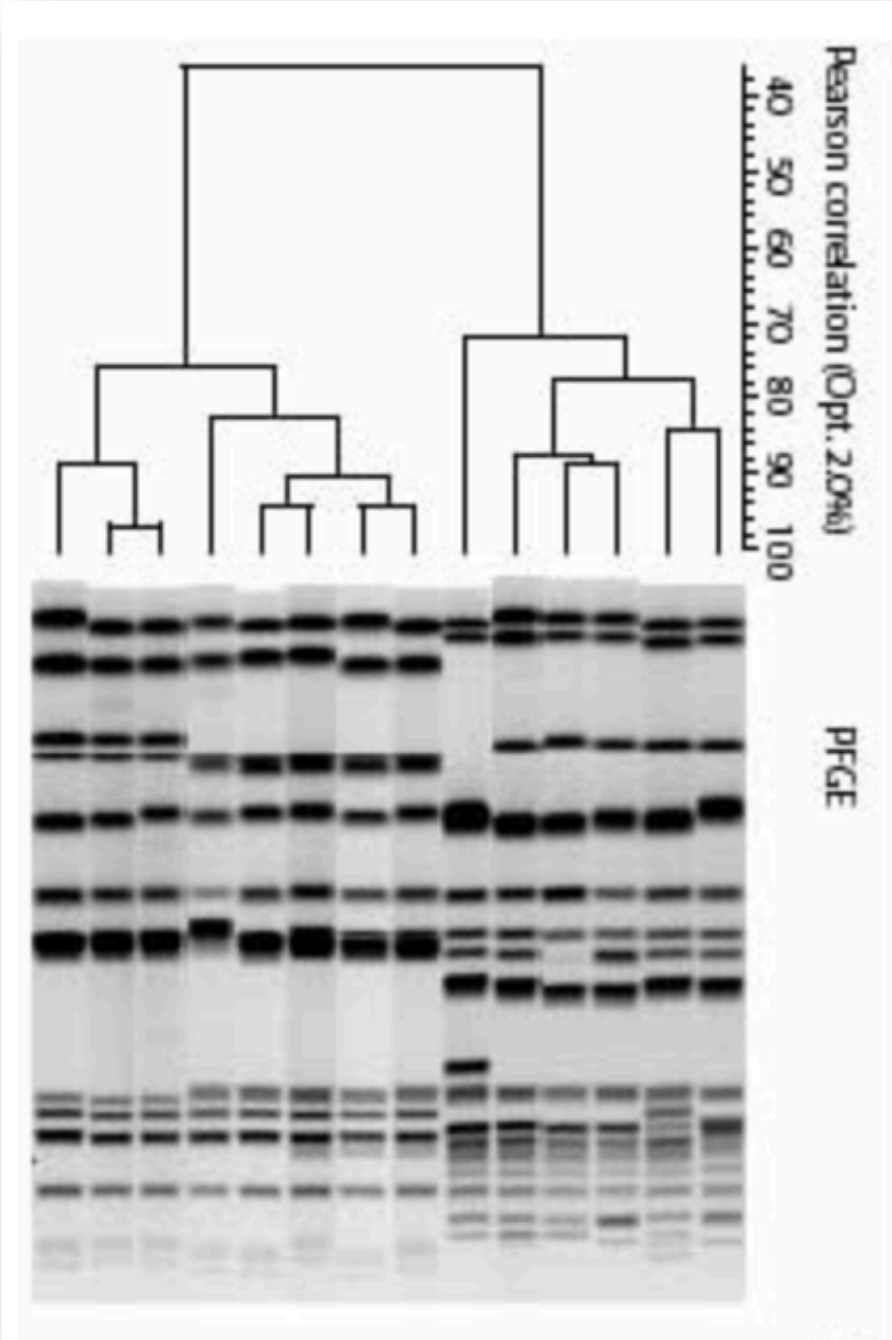
PCR preselettiva:

- Uniformare le estremità dei frammenti
- Amplificare solo i frammenti che hanno gli adattatori

PCR selettiva:

- Rarefazione dei frammenti

AFLPs



AFLPs



Vantaggi:

- Alta riproducibilità
- Nessuna informazione a priori richiesta
- Numero di loci incrementabile (cambiando le basi selettive)
- Possibilità di isolare singoli loci
- **Utile negli screening genomici**

Svantaggi:

- Time-consuming
- Forte assunzione di omologia delle bande co-migrate nel gel
- **DOMINANTE**



AFLPs

Application of AFLP to species identification in commercial sturgeon smoked meat

Comparison of commercial sample against 10 reference species:

- A. ruthenus*
- A. transmontanus*
- A. guldenstaedtii*
- A. sturio*
- A. stellatus*
- A. baerii*
- A. naccarii*
- A. oxyrinchus*
- A. brevirostrum*
- H. huso*



and with some individuals of the claimed species (in this case the white sturgeon, *A. transmontanus*)

The use of AFLP in sturgeon identification

By L. Congiu¹, F. Fontana¹, T. Patarnello², R. Rossi¹ and L. Zane²

¹Department of Biology, University of Ferrara, Ferrara, Italy; ²Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy

Applicazione

- TRACCIABILITA'
- Sicurezza dei consumatori

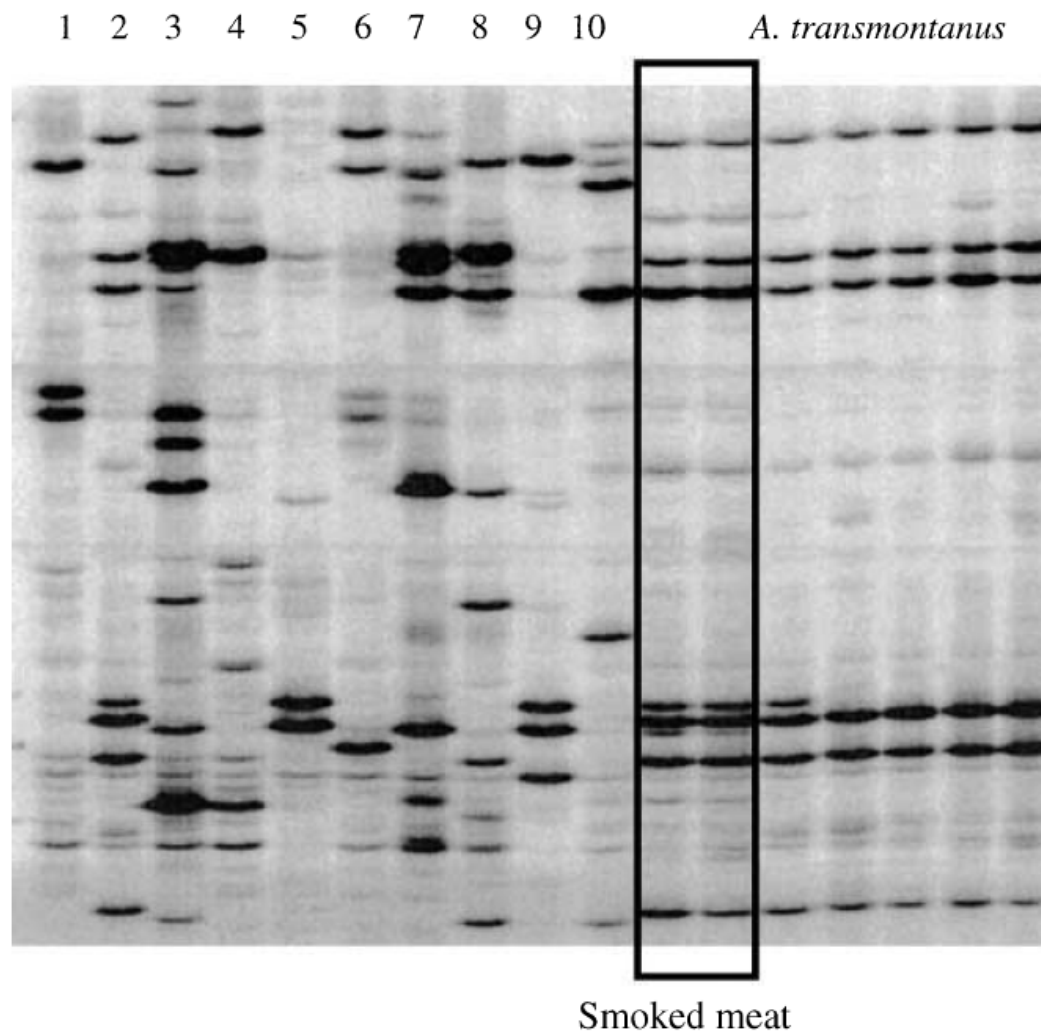


Fig. 1. AFLP analyses of commercial *Acipenser transmontanus* smoked meat (two replicates within black frame). Lanes 1–10 represent 10 reference species (1 = *A. ruthenus*, 2 = *A. transholtanus*, 3 = *A. gueldenstaedtii*, 4 = *H. huso*, 5 = *A. sturio*, 6 = *A. stellatus*, 7 = *A. baerii*, 8 = *A. naccarii*, 9 = *A. oxyrinchus*, 10 = *A. brevirostrum*). On the right, five individuals of *A. transmontanus* used as control

In sintesi . . .

Sequenziamento???

Criterion	DNA hybridiz.	RFLPs	AFLPs	RAPD	Conventional PCR	
Quantity of information	Low	Moderate	High	Moderate	Moderate	High
Requirement of prior information	Yes/No	Yes	No	No	Yes	Yes
Suitability for the detection of mixtures	No	Yes	Variable	Variable	Yes	Yes
Inter-laboratory reproducibility	Moderate	Moderate	Moderate	Poor	Good	Good
Cost of equipments and reagents	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	High
Throughput capacity	Low	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	High
Easy of use	Easy	Easy	Moderate	Moderate	Easy	Moderate