

DNA-PROFILING E GENETICA FORENSE



DNA fingerprinting (profilo del DNA)





Cos'è il DNA-PROFILING?

E' l'unico genotipo di ogni individuo (DNA-profile)

Metodi molecolari genetici....

→ DNA-profiling **distingue un uomo da un altro**
in modo univoco

E cos'è la GENETICA FORENSE?

Applicazione della genetica alle tracce umane e non umane per la risoluzione di conflitti legali

(Jobling and Gill 2004; FSI Genetics 2007)

1-PROGRAMMA DEL CORSO:

Genetica Forense (8 ore):

STRUTTURA E FUNZIONI DEL DNA

- Cenni di citologia
- Struttura del DNA, geni e DNA non codificante
- Mutazioni e polimorfismi del DNA in genetica forense (VNTR, STR, SNP), DNA fingerprinting-DNA profiling; CODIS
- Polimorfismi del Cromosoma Y e del DNA mitocondriale (mtDNA)
- Database del DNA genetici a uso forense (nucleotidiche, aploipiche e di DNA profiling)

GENETICA MOLECOLARE: METODI DI ANALISI DELLA VARIABILITÀ GENETICA A LIVELLO DEL DNA

- ricerca delle tracce biologiche (sangue, saliva, ecc.) tecniche e tecnologie del sopralluogo
- I test per l'identificazione personale (emogenetica classica, diagnosi generica di specie, fonti ordinarie del DNA)
- Tecniche per l'analisi dei polimorfismi
- PCR end-point
- Sequenziamento del DNA
- Real Time PCR (qPCR)

Analisi dei risultati:

- Assegnazione allelica e determinazione del genotipo e software utilizzati
- Interpretazione degli elettroferogrammi: Drop-in; Drop-out; Stutter bands
- Statistica applicata alle indagini genetico-forensi.
- Distribuzioni di frequenza; Test di significatività; Stima delle frequenze alleliche e genotipiche; Stima delle frequenze alleliche a loci codominanti (VNTR o STR); Stima delle frequenze genotipiche a sistemi multilocus
- Identificazione; Probabilità di esclusione; Probabilità di match; Probabilità di identità;

2-PROGRAMMA DEL CORSO:

DNA Barcoding (16 ore)

Sequenze barcode standard: la Citocromo ossidasi I (COI), il Citocromo b e il 16S;

Applicazioni nei settori:

- 1) Epidemiologia e della salute pubblica;
- 2) Difesa dei consumatori;
- 3) Identificazione delle specie presenti nei cibi freschi o processati, per la tracciabilità nelle fasi di produzione, trasformazione, condizionamento e commercializzazione;
- 4) Norme doganali;
- 5) Monitoraggi ambientali.
- 6) Barcode of Life Data System (BOLD) sito che organizza tutte le sequenze degli esseri viventi (www.boldsystems.org).



Laboratorio (24 ore-2 CFU)

Consultazione banche dati DNA: database genetici a uso forense (nucleotidiche, aploipiche, profili genetici); CODIS;

Software utilizzati nella genetica forense applicata; BOLD (Barcode of Life Data Systems)

Analisi citologiche (microscopio) identificazione del gruppo sanguigno umano (ABO e Rh); analisi microscopica e riconoscimento di peli-capelli

Indagini di genetica forense umana:

- Estrazione del DNA da cellule boccali umane (residuo da bottiglia di plastica) e da mozzicone sigaretta; Estrazione del DNA da macchie di sangue

Indagini analitiche degli alimenti:

- Estrazione del DNA vegetali
- Estrazione del DNA da carne animale
- Estrazione del DNA da pesce
- Quantificazione DNA (NanoDrop)

PCR qualitativa o End Point; nested PCR, multiplex PCR (STRs)

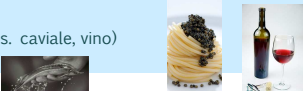
Visualizzazione dei risultati e determinazione del genotipo

PCR quantitativa o Real Time PCR (qPCR) per l'identificazione e quantificazione di specie e/o contaminazione presenti negli alimenti.

DNA-PROFILING e GENETICA FORENSE: applicazioni-4

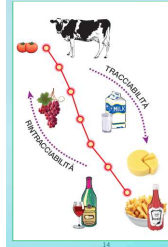
Salvaguardia contro le frodi alimentari

1. Identificare le varietà di origine alimentare; i batteri e altri microrganismi (es. Funghi) che possono inquinare i cibi
2. Determinare il pedigree di semi o di capi di bestiame
3. Autenticare materiali di consumo (es. caviale, vino)



**ETICHETTA ALIMENTI PRECONFEZIONATI
DESTINATI AL CONSUMATORE**
D.Lvo 109/92

- a. Denominazione di vendita
- b. Elenco ingredienti
- c. Quantità netta (nominale)
- d. TMC/data di scadenza
- e. Nome o ragione sociale o marchio depositato + sede fabbricante o confezionatore o venditore
- f. Sede dello stabilimento di produzione o confezionamento
- g. Dicitura per identificazione lotto
- h. Modalità di conservazione/utilizzazione
- i. Istruzioni per uso, se necessario
- j. Luogo di origine o provenienza se necessario
- k. Quantità di alcuni ingredienti/ categorie di ingredienti caratterizzanti

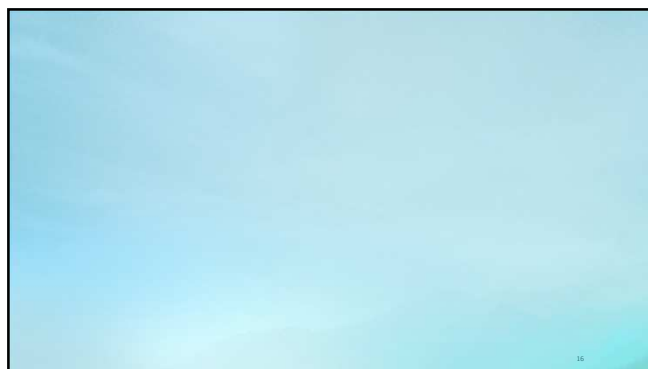


1-FRODI COMMERCIALI

- Favoriscono illeciti profitti a danno del consumatore

2-FRODI SANITARIE

- Hanno la probabilità o certezza di procurare un danno anche grave, alla salute dei cittadini

Storia dei metodi di identificazione

UTILIZZATI QUANDO?	METODI DI IDENTIFICAZIONE	GRADO DI PRECISIONE
1800	Misura dell'altezza (Quetelet's method)	1 in 4
	Confronto tra peli pubici	1 in 800
fine del 1800-inizi del 1900	Confronto tra capelli	1 in 4500
fine del 1800-inizi del 1900	Antropometrico (Bertillon's method)	1 in 268 milioni
	Odontoiatria Forense Teeth bite marks	1 in 2.5 miliardi
Evidenze nel primo Egitto – documentato per uso forense dal 1800 al 1900	Dattilografia (impronte digitali)	?
fine del 1900	DNA Fingerprinting	1 in 2×10^{22}
fine del 1900-inizi del 2000	Ricoscimento facciale	?

AFIS è l'acronimo di Automated Fingerprint Identification System
Sistema Automatizzato di Identificazione delle impronte



Quetelet, creatore della formula BMI

$$BMI = \frac{\text{weight in kilograms}}{\text{height in meters}^2}$$


USA: primo studio sul software che identifica le persone da una foto.

Serve per catturare criminali, ma a oggi non ci sono regole e limiti

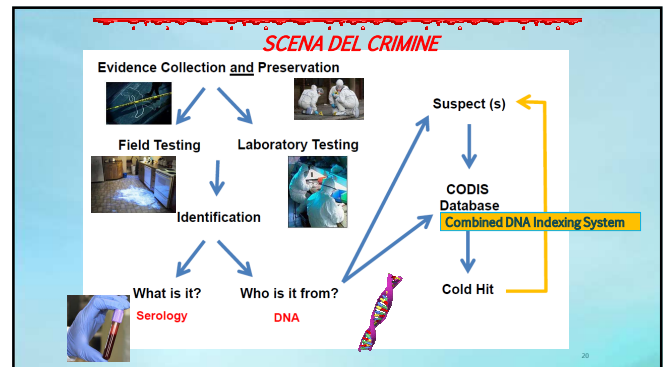
Identificazione personale: il metodo di Bertillon (1853-1914)




Primo metodo scientifico di segnalamento: i criminali venivano rilevati con di 11 misure del loro corpo (apertura delle braccia, statura, circonferenza del capo, eccetera).

Segnalazione antropologica completata da una minuziosa segnalazione descrittiva (*portrait parlé*= il ritratto parlato) ~identikit e della foto segnaletica + fotografie di diverse parti del corpo (naso, orecchio, eccetera) dei criminali.

	ASPETTO BIOMETRICO	IMPRONTA DIGITALE	IRIDE	VOCE	GEOMETRIA FACIALE	GEOMETRIA DELLA MANO
						
Confronto tra alcune tecnologie biometriche in funzione dei requisiti essenziali	Limiti alla universalità	Menomazioni o disabilità	Menomazioni o disabilità	Menomazioni o disabilità	Nessuno	Menomazioni o disabilità
	Unicità	Alta	Alta	Bassa	Bassa	Media
	Permanenza	Alta	Alta	Bassa	Media	Media
	Catturabilità	Media	Media	Media	Alta	Alta



ABBIAMO UN SOSPETTATO: È stato commesso un crimine e c'è una traccia di DNA; indagini condotte con metodi tradizionali portano a **sospettare pesantemente di una certa persona**. questa viene arrestata e viene fatto l'esame del DNA (per tutti i loci inseriti nel CODIS); il profilo del DNA corrisponde (**perfect MATCH**) → sospettato viene incriminato.

NON ABBIAMO UN SOSPETTATO: 'cold hit' (colpo a freddo): è stato commesso un crimine e c'è una traccia di DNA.

Non c'è alcun sospettato; viene setacciato un grande database del DNA (CODIS) e si trova **una e una sola persona** che è positivo al test del DNA → la persona in questione viene arrestata e incriminata (**DATABASE MATCH PROBABILITY-DMP**). Qualcuno, che al giorno prima non era neppure indagato, viene arrestato e incriminato, in base alla ricerca in un database, pertanto costui viene 'colpito a freddo'.



Medico forense/patologo

Riscontra l'ora della morte

Contribuisce a determinare la causa delle morte:

- naturale
- incidentale
- omicidio
- suicidio



Morte del corpo e degradazione del DNA

<http://uk.businessinsider.com/what-happens-to-your-body-after-you-die-2016-5?r=US&IR=T>

7. I LIVELLI DI O2 E L'ATTIVITÀ MICROBICA → Rottura di membrane così gli enzimi lisosomiali rilasciati e degradazione del DNA casuale. Indipendentemente dalla modalità di cellula la morte, il DNA è suddiviso in piccole lunghezze dagli enzimi endogeni generando campioni degradati per l'analisi genetica a valle.

Il sangue cessa di ossigenare i tessuti con O_2 e dare nutrimento

→ calo di ATP dentro la cellula (alla fine rigor mortis)

→ dsDNA si frammenta in pezzi più piccoli (<300 bp):

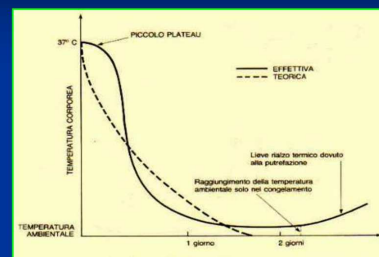
→ amplificazione con PCR difficile, con parziale o nessun DNA profiling.

Processi di morte una cellula subirà (apoptosi o necrosi):

- 1) **Apoptosi:** morte cellulare programmata caratterizzata dalla *perdita della membrana plasmatica, condensazione del citoplasma ed estesa frammentazione del DNA (180 bp)* per azione di **endonucleasi endogene**;
- 2) **Necrosi:** *collasso metabolico passivo* con aumento del volume delle cellule, organelli e la condensazione della cromatina.

25

CURVE DI RAFFREDDAMENTO DEL CADAVERE: EFFETTIVA E TEORICA

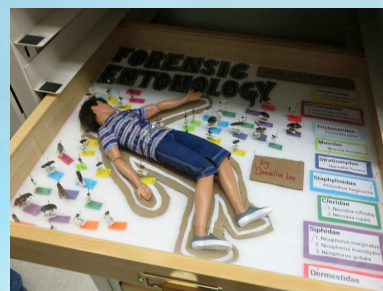


- Dalla decomposizione putrefattiva delle sostanze organiche si formano, ed è noto, composti basici azotati, le ptomaine, che in parte si comportano come alcaloidi dal punto di vista chimico, alcune inerti, altre tossiche.
- L'andamento della putrefazione è influenzato da vari fattori di diversa natura, inerenti al cadavere o all'ambiente esterno, cioè intrinseci o estrinseci.

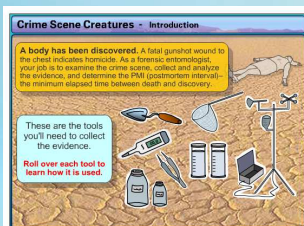
- Età
- Costituzione fisica
- Cause e modalità del decesso
- Integrità del cadavere

- temperatura ambiente: quella compresa tra i 25° e i 35°C. è ottimale
- umidità dell'aria
- Indumenti
- 1 h in estate = 1 giorno in inverno
- Regola di Casper: $x = 1,2,8$

Entomologia forense



Entomologia forense



X

Entomologia forense: fauna cadaverica

Insects and their **life cycles** and **behaviors** to give them clues about a crime.

Most insects used in investigations are in two major orders:

1 – Flies (**Diptera**)
2 – Beetles (**Coleoptera**)



Ditteri



Coleopteri

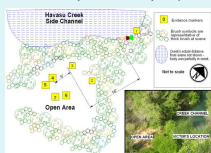
[illegible]

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : LOCALITÀ APERTA

- rilevare le vie d'accesso,
- lo stato del terreno (solido, fangoso),
- le condizioni di visibilità,
- la temperatura e l'umidità ambientali (per la loro influenza sui fenomeni cadaverici),
- la presenza di siepi, mura o palizzate, l'esistenza di corsi o di pozzi d'acqua (dove si può trovare il cadavere o l'arma del delitto).

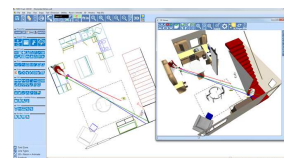
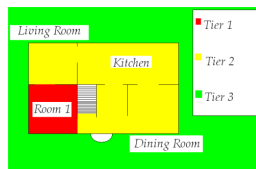


Il delitto di via Poma (assassinio di Simonetta Cesaroni) 7 agosto 1990 nel palazzo di via Carlo Poma n° 2 a Roma, è tuttora irrisolto



37

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DEGLI AMBIENTI CHIUSI



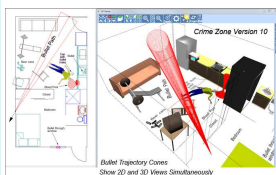
The Three Main Tiers of a Crime scene.

Diagramed is a theoretical crime scene in which a murder was committed. Room 1 (red) is where the crime took place. The living room, kitchen, and dining room (Yellow) are the second tier designated for official personnel briefing and break space. The third tier (green) is the outside area, to restrict non-investigative persons from the scene

38

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DEGLI AMBIENTI CHIUSI

- accessi,
- stanze adiacenti,
- Porte e finestre,
- il tipo di riscaldamento (per stabilire eventuali intossicazioni da monossido di carbonio),
- lo stato dei pavimenti e delle pareti,
- gli oggetti presenti,
- l'ordine o il disordine,
- le varie tracce e in particolare quelle nei servizi igienici e nei lavandini.



39

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME dei veicoli semoventi

- esaminate la posizione delle vittime,
- le tracce lasciate dagli pneumatici in frenata,
- la perdita di olio o di carburante,
- i segni dovuti all'impatto dei veicoli contro paracarri, muri o alberi,
- i frammenti di cristallo,
- i resti di vernice,
- il disegno del battistrada,
- i frustoli di pelle e di grasso sottocutaneo,
- i ciuffi di peli e il sangue trovati sul veicolo.



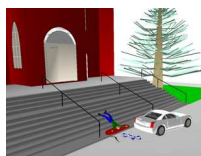
Show textures like grass and gravel in 2D and 3D diagrams. You control Version 9's new light source shading and reflectivity to create realistic 3D models.

40

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DELLA LOCALITÀ

Vanno sempre ricercati segni di lotta.

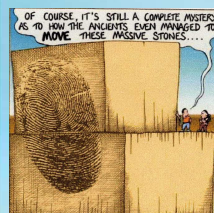
- che si possono desumere dal calpestamento del terreno,
- dagli arbusti spezzati,
- dal disordine degli ambienti;
- segni di scasso sulle porte e sulle finestre;
- segni di trascinato del cadavere in base alle tracce sul terreno;
- segni di gas tossici;
- segni di intossicazioni o avvelenamenti;
- segni di proiettili su pareti, tronchi, foglie,
- reperiti di bossoli e cartucce.



41

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DELLE IMPRONTE

lasciate da: **uomo, animali, veicoli o/e oggetti vari** nella località ispezionata. Si possono trovare sul cadavere o sui suoi vestiti, sul terreno, sul pavimento, sulle pareti, sui mobili, sulle porte ecc.



AFIS=Automated Fingerprint Identification System, cioè il "Sistema Automatizzato di Identificazione delle Impronte"



42

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DELLE IMPRONTE



1. **compressione** su materiali cedevoli (sabbia, fango, neve, sterco);
2. **asportazione** quando si toccano oggetti polverosi, verniciati di fresco o untuosi;
3. **apposizione** quando si imbrattano oggetti o superfici con le mani bagnate di sudore o sporche di sangue

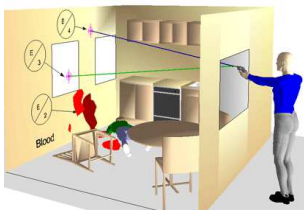
43

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DELLE IMPRONTE

- a) si formano su qualsiasi oggetto
- b) caratteri normali (diametri, lunghezza e larghezza delle dita) e patologici (es. amputazioni di dita o di falangi)
- c) nudi che calzati (orme), le tracce dei piedi permettono di risalire all'età e alla statura della persona, al suo modo di camminare o di correre, ad anomalie congenite o acquisite.
- d) lasciano orme (es. calco con materiali adatti-gesso)
- e) sulla cute o sugli alimenti consistenti (pane, burro e frutta) e si rilevano mediante un calco o rilievi fotografici. Anomalie dentarie (es. righe d'incisione per le scanalature dei denti e i segni di protesi).

44

RICOSTRUZIONE DELL'EVENTO CRIMINALE DALL'ANALISI DELLE TRACCE



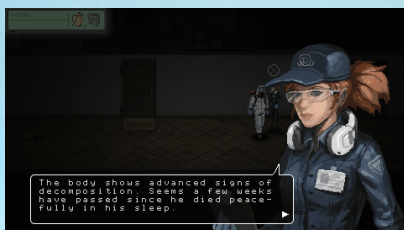
45

Repertazione...e sopralluogo...

Consiste in quell'insieme di operazioni mediante le quali gli investigatori raccolgono tutti gli oggetti che potranno costituire fonte di prova e provvedono a custodirli con i dovuti accorgimenti.
Regolamentata dall'art. 348 commi 1 e 2 c.p.p., finalizzata "alla ricerca delle cose e delle tracce pertinenti al reato nonché alla conservazione di esse e dello stato dei luoghi".

46

Repertazione e sopralluogo



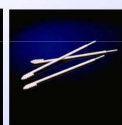
47

Repertazione e sopralluogo

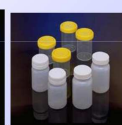
Impiego di materiale dedicato per la repertazione e conservazione del campione biologico



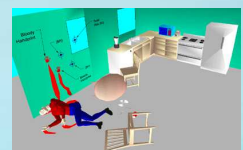
Sistemi di protezione



Tamponi sterili



Contentori idonei



48

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.



Touch DNA

Table 1: Summary of amount of DNA detected via contact.

Amount of DNA	Mean	Contact type/substrate	Source
0 - 5.2ng	0.52ng	glass held for 60s	Daly, et al ⁴
0 - 14.8ng	1.23ng	fabric held for 60s	Daly, et al ⁴
0 - 169ng	5.85ng	wood held for 60s	Daly, et al ⁴
0.16 - 6.4ng	[blank]	swab of hands	Bright & Petricovici ⁵
0.04ng	[blank]	fingers pressed on various substrates for 30s	Alexandini, et al ⁶
0 - 50.8ng	1.7ng	various volume crime evidence items	Raymond, et al ⁷
[blank]	4.3ng	wallets held for 60s	Raymond, et al ⁷
3.1 - 33ng	11.7ng	wallets held for various times	van Oorschot and Jones ⁸
[blank]	17.8ng	plastic knife held for 15 min.	van Oorschot and Jones ⁸
6.8ng	[blank]	mug held for 15 min.	van Oorschot and Jones ⁸
34ng	[blank]	glass held for 15 min.	van Oorschot and Jones ⁸
[blank]	51ng	vinyl gloves worn for 20/90 min.	van Oorschot and Jones ⁸
[blank]	11.68ng	cotton rubbed with palm, finger, and side of hand for 15s	Garay, et al ⁹
[blank]	0.396ng	plastic rubbed with palm, finger, and side of hand for 15s	Garay, et al ⁹



56

Tipo di Campione	Probabilità di Successo	Note
Sangue fresco	Alta	
Sangue - spot su carta	Alta	
Tempione buccale	Alta	Tempione standard.
Capelli	Alta	Il capello deve essere con bulbo visibile e deve essere estratto dalla radice.
Liquido Seminale	Alta	
Liquido Seminale su vestiti o tamponi vaginali	Media	Il successo dipende dalla quantità della macchia e dal numero di spermatozoi.
Residuo di sangue su tessuto o carta	Media	Il successo dipende dalla quantità della macchia, l'età e l'esposizione agli agenti atmosferici.
Assorbente femminile usato	Media	Il successo dipende dalla quantità della macchia, l'età e l'esposizione agli agenti atmosferici.
Somma da macchiare (cheering gum)	Media	
Cicca di sigaretta	Media	
Sangue cadaverico	Media/Bassa	
Unguento	Media	
Urine	Bassa	
Capelli caduti	Bassa	Bassa probabilità di successo in caso di fase vitale del capello "catagen" o "telogen". In quest'ultimo caso è consigliabile l'analisi del DNA Mitochondriale.
Cosa	Bassa	Bisogna minima 1g di campione.



57

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI : ESAME DELLE MACCHIE

QUANTITA', TIPO, STATO, ETA' DELLA TRACCIA, e dal livello tecnologico del laboratorio

- SANGUE** → vittima o aggressore?
- SPERMA** → violenza o atti sessuali?
- VOMITO** → avvelenamento?
- LIQUIDI CORROSIVI** → suicidio con caustici?
- UNTO, VERNICE, CARBONE, FARINA** ecc. → professione dei protagonisti?
- POLVERE, FANGO** sul cadavere o sui suoi vestiti → trascinamento o un rotolamento?
- ALTRI LIQUIDI ORGANICI** (feci, urine, fluido vaginale, colostro, saliva, liquido amniotico ecc.) → assumono importanza varia nei singoli casi



58

E' sufficiente una quantità minima di campione



59

tuttavia il test del DNA:

- Non può dire **QUANDO** la traccia è stata deposta
- Non può dire in **QUALI CIRCONSTANZE** e come la traccia è stata deposta (**MODALITÀ**)
- Spiegare quale in 1 Traccia "MISTA" SIA STATA DEPOSTA per prima
- Spiegare come in 1 Traccia "MISTA" LA COMPONENTE MINORE sembra "SPARIRE"

60

Forensic Databases

- **IAFIS:** Integrated Automated Fingerprint Identification System, a national fingerprint and criminal history system maintained by the FBI.
- **CODIS:** Combined DNA Index System, enables federal, state, and local crime laboratories to electronically exchange and compare DNA profiles.
- **NIBIN:** National Integrated Ballistics Information Network allows firearm analysts to acquire, digitize, and compare markings made by a firearm on bullets and cartridge casings.
- **PDQ:** International Forensic Automotive Paint Data, query database contains chemical and color information pertaining to original automotive paints.
- **SICAR:** shoeprint image capture and retrieval, is a shoeprint database.

61

Forensic Serology

Presumptive Tests:

- Used for preliminary screening
- Prone to false positive and false negative
- Test is mostly chemical in nature
- Look for a color change or luminescence (usually a catalyzed oxidation reaction)

Confirmatory Tests:

- Used for confirmation / validation (alone or in conjunction with a presumptive test)
- False positive is rare, but false negative can happen
- Test is chemical, biological, or physical in nature
- Identify/detect UNIQUE characteristics using various technologies

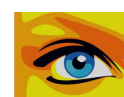


DIAGNOSI DI GENERE: osservazione

1. CON GLI OCCHI (VISIVA)
2. CON LUCE FORENSE (FISICA)
3. CON LUMINOL (CHIMICA)
4. COL MICROSCOPIO

63

DIAGNOSI DI GENERE: osservazione visiva



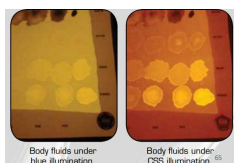
64

DIAGNOSI DI GENERE: osservazione fisica (luce forense)

CrimeScope® CS-16-500W-15F
The Ultimate Forensic Light Source.
"The flagship of the SPFX Forensics product line."

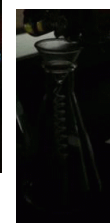
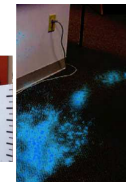
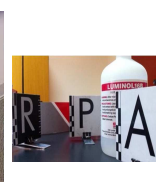
Designed to cover all the applications possible for a Forensic Light Source.
The CS-16-500W-15F is ideal for most forensic applications. It provides a powerful, yet controlled, output for forensic use. While designed to be controlled in use, the CrimeScope® is small enough to be taken to the crime scene and used in the field. The CS-16-500W-15F covers the UV and Visible portions of the spectrum and is available with optional IR. It continuously emits allowing for complete coverage of the spectrum.

For Lab Work, as Well as Crime Scenes:
Fingerprint enhancement, surface analysis, body fluids, trace evidence, shoe marks and smudges, shoeprints, gun shot residues, bone fragments, drugs, etc.



http://wiki.bolli.it/wiki/index.php?title=Utilizzo_pratico_della_fluorescenza

DIAGNOSI DI GENERE: osservazione chimica (luminol)



Luminol
<chem>C1=CC=C(C=C1)C(=O)N2C=CC=CC2=O</chem>
Nome IUPAC: 2,2,6,6-tetrametil-5-oxo-3,4-dihidro-1,2,4-triazina-5-carbaleide
Formula molecolare: C ₆ H ₆ N ₄ O ₂
Formula bruta: C ₆ H ₆ N ₄ O ₂
Numero CAS: 148-70-1
Numero EINECS: 205-000-1
Numero CE: 205-000-1
Numero EC: 205-000-1
Numero EN: 205-000-1
Numero EL: 205-000-1
Numero ES: 205-000-1
Numero FI: 205-000-1
Numero FR: 205-000-1
Numero GR: 205-000-1
Numero IT: 205-000-1
Numero NL: 205-000-1
Numero PT: 205-000-1
Numero RO: 205-000-1
Numero SI: 205-000-1
Numero SK: 205-000-1
Numero SL: 205-000-1
Numero TR: 205-000-1
Numero UK: 205-000-1
Numero US: 205-000-1
Numero VE: 205-000-1
Numero ZA: 205-000-1

65

Compound	Use	Color	Sensitivity	Persistence	Interference	Damage
Luminol	Reagent for latent bloodstains	Blue glow	0,0001 ml of blood	Photographs should be taken within a few hours	Copper salts, brass, bronze and other similar alloys	No damage
Kastle-Meyer test	Reagent for latent and visible bloodstain	Pink	0,000 001 ml of blood	Immediate change of color	Vegetable peroxidases, copper, nickel salts	Damage of DNA
LCV	Latent prints, deposited blood on non-porous surfaces, visible blood prints	Purple	0,001 ml of blood	Immediate change of color	Copper, nickel and other similar salts	Damage of DNA
Takayama test	Reagent for latent bloodstain	Pink crystals	0,001 ml of blood	Formation of crystals	none	Damage of DNA
Fluorescein	Reagent for latent bloodstains	Green fluorescence	0,0001 ml of blood	Photographs should be taken within a few hours	Copper, nickel and other similar salts	No damage
Amido black	Latent prints and to enhance visible blood prints on painted surfaces	Dark blue	0,001 ml of blood	Photographs should be taken within a few hours		Damage of blood sequence

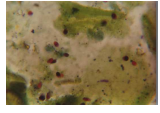
CRIME SCENE-DO NOT ENTER

DIAGNOSI DI GENERE: osservazione microscopica



SALIVA O LIQUIDO SEMINALE?

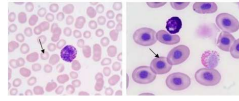
TESTS CONFIRMATORI



DIAGNOSI DI SPECIE

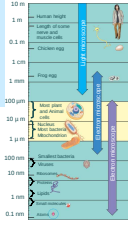
METODI:

- MORFOLOGICI (microscopio)




Different types of microscopes

- Light microscopes (LM.s)**
 - Pass visible light through a specimen
 - Magnify cellular structures with lenses
- Electron microscopes (EM.s)**
 - Focus a beam of electrons through a specimen (TEM) or onto its surface (SEM)



Calvin Goddard (1891 – 1955)

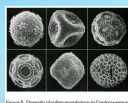
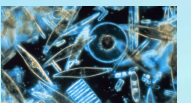


Used a comparison microscope to determine if a bullet was fired from a specific gun

Measurements:

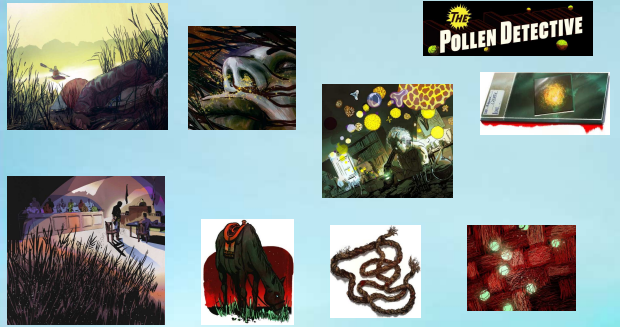
- 1 centimeter (cm) = 10^{-1} meter (m) = 0.4 inch
- 1 millimeter (mm) = 10^{-3} m
- 1 micrometer (μ m) = 10^{-6} m = 10^{-3} mm
- 1 nanometer (nm) = 10^{-9} m = 10^{-6} mm

DIAGNOSI DI SPECIE


Phenom SEM image of corn pollen

THE POLLEN DETECTIVE



Toxins in Hair

Hair is capable of recording medium to long-term or high dosage substance abuse.

Chemicals in the bloodstream may be transferred to the growing hair and stored in the follicle, providing a rough timeline of drug intake events.

Head hair grows at rate of approximately 1 to 1.5 cm a month, and so cross sections from different sections of the follicle can give estimates as to when a substance was ingested.

Napoleon Bonaparte (1769-1821), Emperor of France 1804-1814



© NPG D203399

Did the British poison him in prison?



Se i capelli sono stati strappati con forza da una vittima, l'intero follicolo pilifero può essere presente

Se ciò si verifica, sangue e tessuti allegati al follicolo possono essere analizzati (es. proteine del sangue) e analisi del DNA possono essere eseguite anche su cellule da capelli con follicolo.

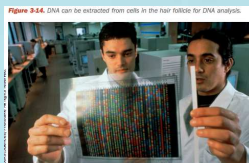
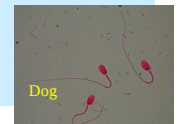
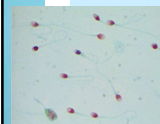


Figure 9-68

DNA can be extracted from cells in the hair follicle for DNA analysis

Sperm ID

- **Confirm** the presence of semen by microscopically identifying sperm cells
- Most common staining method is stain called Christmas Tree Stain (Prepared or commercially supplied)



DIAGNOSI DI SPECIE

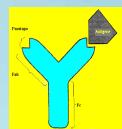
METODI:

1. MORFOLOGICI (microscopio)
2. IMMUNOCHEMICI (Elisa)

Interazione antigene-anticorpo

Sistema chiave (Ab)-serratura (Ag)

IMMUNOCOMPLESSO: unione che si instaura tra un Ag + corrispondente Ab (legami di natura non covalente) che agiscono tra i determinanti dell'Ag e dell'Ab. Determina una serie di eventi effettori finalizzati alla definitiva distruzione o neutralizzazione dell'Ag.



Quando, per una determinata concentrazione di Ag,

$$[Ag-Ab] = [Ab]$$

cioè i siti antigenici dell'Ab, sono saturati per $\frac{1}{2}$ con l'Ag, $\rightarrow$ il valore del reciproco della concentrazione dell'Ag libero sarà uguale alla costante di affinità.

$$K = 1/[Ag]$$

K = Costante di associazione

Affinità: forza dell'interazione antigene-anticorpo (o aptene-anticorpo) misurata dalla costante di equilibrio della reazione di associazione

Reazione antigene-anticorpo: reazione dinamica e reversibile tra un anticorpo e un antigene per dare origine al complesso antigene-anticorpo. E' caratterizzata da una costante di equilibrio definita.

Immunogeno: sostanza antigenica (antigene, coniugato aptene-proteina) che in contatto con un ospite immunocompetente è capace di stimolare la produzione di anticorpi specifici.

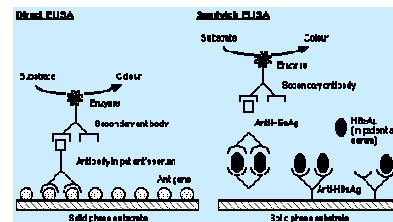
Sito legante anticorpale (paratopo): regione della molecola anticorpale capace di combinarsi con il corrispondente determinante antigenico.

Determinante antigenico (epitopo): elemento strutturale della molecola antigenica riconosciuto dall'anticorpo e capace di combinarsi con il corrispondente sito legante anticorpale.

Marcatore: sostanza (radioisotopo, enzima, fluoroforo ecc) che introdotta nella struttura di un reagente (antigene, aptene, anticorpo) ne consente la rivelazione

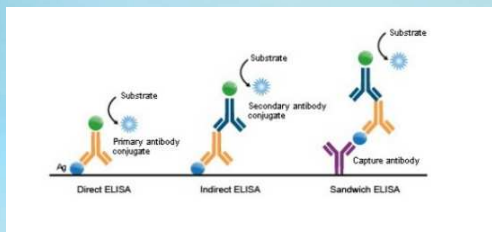
85

Saggio ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

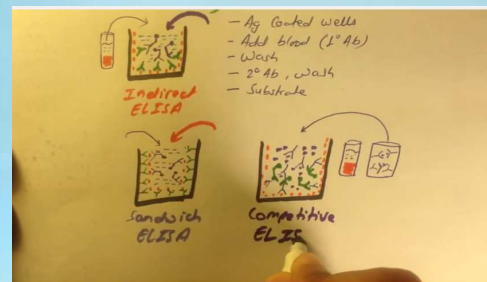


86

Saggio ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)



87

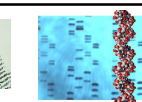


<http://laboratoryinfo.com/elisa/>

88

Tutte le applicazioni passano per la TRACCIABILITÀ INDIVIDUALE

- Identificare nell'individuo modelli unici nel suo DNA
- Confronto con un DNA di un campione di riferimento



Tracciabilità genetica individuale

A) pannelli di marcatori microsatelliti (STRs)

B) SNPs principalmente per test di parentela e controllo della tracciabilità individuale, nuove tecnologie (SNPs: 30-50 markers)



→ AUTOMAZIONE E RIDUZIONE DEI COSTI

89

Siamo tutti (quasi) unici

La maggior parte del DNA è altamente conservato da una persona all'altra (circa il **99,9 %** del DNA tra due esseri umani è uguale)

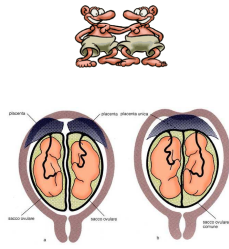
Solo una piccola quantità (0.1%) è molto variabile

E I GEMELLI IDENTICI? (1/3 MZ)

1/3 MZ (identici, monozigoti):

1 cellula uovo è fecondata da 1 spermatozoo→

→zigote si divide in 2 → 2 embrioni separati



91

2/3 sono gemelli **DIZIGOTI (DZ) (ETEROZIGOTI)** che nascono quando la donna rilascia più di 1 ovulo (es. 2 ovuli dalla stessa ovaia o 1 per ovaia)→

→ognuno di essi viene fecondato da 1 spermatozoo→ **2 feti geneticamente diversi**, ognuno con la propria placenta.

I DZ stesso sesso oppure no e potranno assomigliarsi come due normali fratelli.

92

Siamo tutti (quasi) unici



Gemelli identici il DNA non è mai praticamente identico.

→**fattori epigenetici** (ambiente, abitudini, emozioni)



Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific high-resolution melt curve analysis
Leander Stewart, Neil Evans, Kimberley J. Bexon, Deudonne J. van der Meer, Graham A. Williams*

HRMA
(High Resolution Melt Curve Analysis)

Si fonda sul riscaldamento del dsDNA al fine di romperne i legami a idrogeno raggiungendo la TM. La TM varia a seconda della quantità di legami presenti.

93

Se una sequenza di DNA di un gemello è più metilata dell'altra, avrà una temperatura di melting più alta.

LIMITI HRMA: la metilazione NON subisce grosse variazioni nei gemelli giovani o in quelli cresciuti in contesti o con stili di vita simili.

Inoltre i laboratori, per effettuare il test, *hanno bisogno di una elevata quantità di campioni* che non sempre sono presenti sulla scena del crimine.



94

Double-Stranded DNA



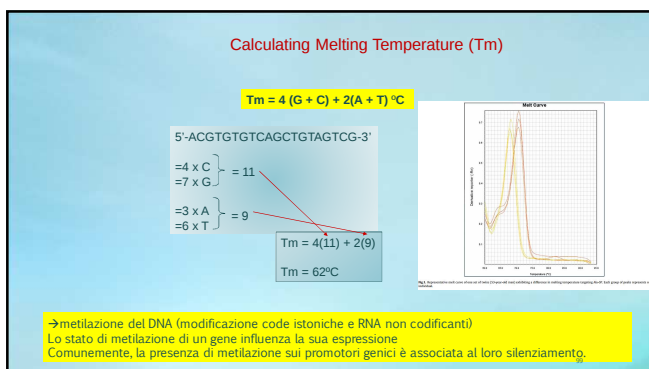
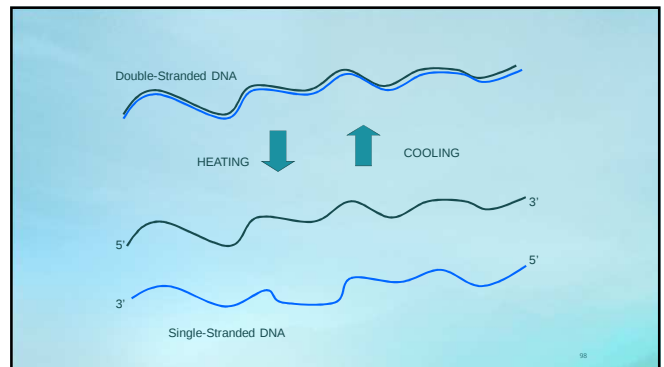
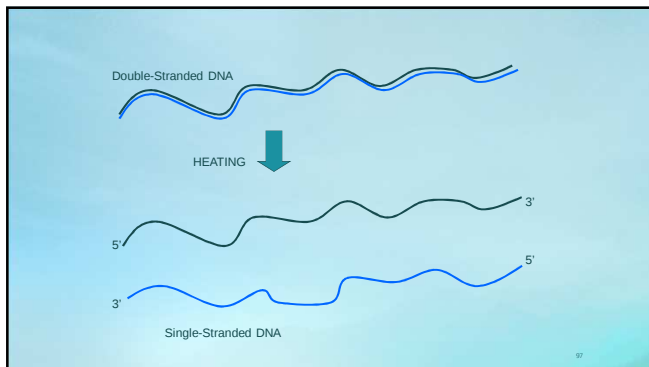
95

Double-Stranded DNA



HEATING
↓

96



Factors Affecting T_m

- G-C content of sample
- Presence of intercalating agents (anything that disrupts H-bonds or base stacking)
- Salt concentration
- pH
- Length

Siamo tutti (quasi) unici

- Queste differenze individuali → confronto (tracciabilità genetica individuale).
- I Minisatelliti (VNTR) sono brevi sequenze (10-60 pb) di DNA ripetitivo che mostrano una maggiore variazione da una persona all'altra rispetto ad altre parti del genoma.
- Il primo minisatellite è stato scoperto nel 1980.

I minisatelliti sono MARCATORI MOLECOLARI POLIMORFI

POLIMORFISMO: Presenza di varianti alleliche per un dato gene: un locus genico viene definito polimorfico se di esso si conoscono almeno 2 forme alleliche, di cui la più rara ha una frequenza di almeno l'1% (polimorfismo fenotipico, proteico, genetico, cromosomico, molecolare)

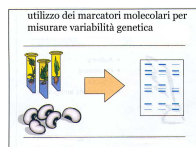
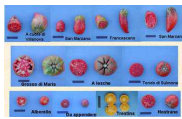
MARCATORE GENETICO: Locus genico che identifica in modo univoco una regione cromosomica

MARCATORE MOLECOLARE: Differenze evidenziabili a livello di DNA: è un frammento di DNA, (locus) rilevabile con sonde o inneschi specifici (PCR)

I MARCATORI SONO UNIVERSALI; EREDITABILE (MENDELIANO)

I marcatori....

Per avere una utilità pratica un marcatore deve essere polimorfo



103

Il marcatore ideale...

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

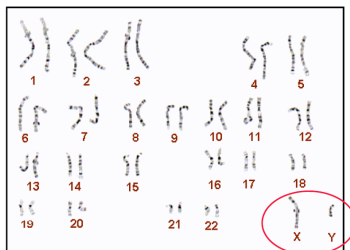


104

Human DNA: Chromosomes

1. Eredità mendeliana

23 Pairs of chromosomes in every human cell (with few exceptions):
One copy from Mom, one copy from Dad



105

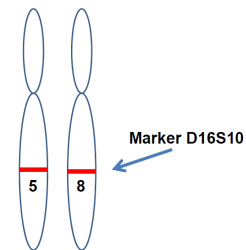
Locus (Loci): Location on a Chromosome

1. Eredità mendeliana
2. Codominanza

Locus = Marker

Chromosome 16

Remember:
one copy from mom
one copy from dad

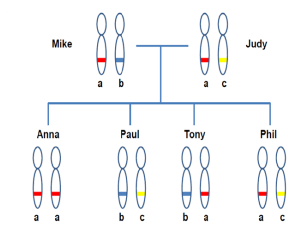


106

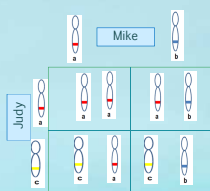
1. Eredità mendeliana

2. Codominanza

Allele Inheritance for Locus "Cat Allergy1"

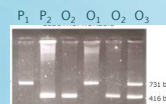


L'allergia ai gatti è data da una proteina chiamata Fel D1 che viene prodotta in parte dalle ghiandole sebacee del gatto e in parte si trova nella saliva.

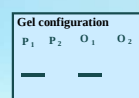


107

Co-dominant marker



Dominant marker



2. Codominanza

Polymorphism

- Parent 1 : one band (731 bp)
- Parent 2 : one band (416 bp)
- Offspring 3 : heterozygote = both bands
- Offsprings 2 and 1: homozygote parent 1 or 2

Polymorphism

- Parent 1 : one band
- Parent 2 : no band
- Offspring 1 : homozygote parent 1
- Offspring 2 : ????

108

Al di là dell'utilità pratica di un polimorfismo è bene sottolineare che molti di essi hanno un **SIGNIFICATO BIOLOGICO**



E' comunque necessario utilizzare marcatori esaminabili su un **tessuto facilmente prelevabile** e che possono essere studiati con una tecnica semplice e a basso costo



SVILUPPO DEI MARCATORI GENETICI NELL'UOMO

Tipo di marcatore	n° loci	Caratteristiche forensi
Gruppi sanguigni 1910-1960	≈ 20	necessità di sangue fresco, talora dominanza
Varianti proteiche 1960-1975	≈ 30	necessità di sangue fresco, saggi specialistici, polimorfismo limitato (spesso solo 2 alleli)
RFLP 1975-	>10 ⁵	2 alleli; poco informativi; necessità di grande quantità di DNA, procedimento lungo e costoso
VNTR (minisatelliti) 1985-	>10 ⁴	multi alleli, altamente informativi, limitati alle regioni telomeriche
STR (microsatelliti) 1989-	>10 ⁵	multi alleli, altamente informativi e distribuiti in tutto il genoma
SNP	>10 ⁶	meno informativi degli STR ma se ne possono esaminare contemporaneamente migliaia

Tasso di mutazione

- * 1 gamete su 10⁻⁶ porta una mutazione a un determinato locus
- * nel genoma umano ci sono c.a. 20.000 geni
- * In totale i gameti portatori di mutazione a un qualsiasi locus codificante saranno 20.000 x 10⁻⁶ = **2 %**

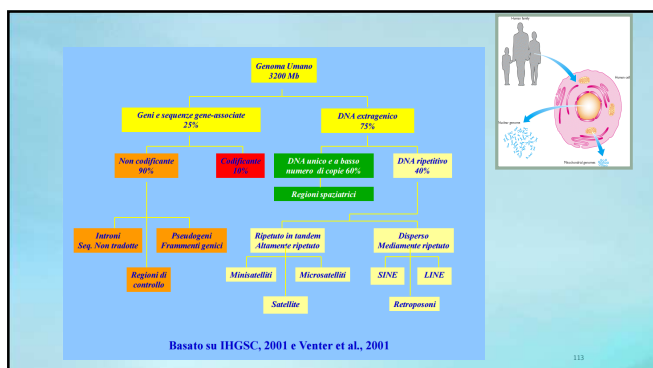
TIPO DI MUTAZIONE	TASSO DI MUTAZIONE
SNP*	10 ⁻⁸ (>2%)
Inserzioni e delezioni (indel) (da puntiformi a varie Kb)	evento raro
Microsatelliti (2-9 bp)	10 ⁻³ -10 ⁻⁴
Minisatelliti (10-100 bp)	10 ⁻² -10 ⁻³

*uniformemente distribuite in tutto il genoma, con una densità leggermente superiore nelle regioni non codificanti (se ne conoscono vari milioni).

Qualche PARAMETRO QUANTITATIVO che descrive la variabilità genetica di un polimorfismo sono:

- 1) grado di eterozigotità (H):** ETEROZIGOTI (2pq) di una popolazione → nel caso di 2 alleli ha un valore max = 0.5 (p = q = 0.5). Misura la variabilità ENTRO la popolazione considerata
- 2) Proporzione di loci polimorfici (P):** N° loci polimorfici / n° tot. loci campionati.
Se 3 loci su 10 sono polimorfici e 7 sono monomorfici, allora P = 3/10 = 0.3.
- 3) Diversità allelica (A):** N° medio di alleli per locus.
Se il numero di alleli per 5 loci è 2, 3, 2, 1, allora A = (2+3+2+1)/5 = 1.6
- 4) PIC = (Polymorphism Information Content)** si riferisce alla capacità del marcatore di rivelare il polimorfismo e dipende dal numero di alleli (informatività) e dalla distribuzione della loro frequenza
 $PIC = 1 - \sum (frequenze alleliche)^2$

→ esprime la probabilità che un individuo sia eterozigote per 2 alleli ad un locus.
→ Tanto più >>PIC → tanto + il marcatore molecolare è abile nell'esprimere il polimorfismo dell'allele, in quel dato locus

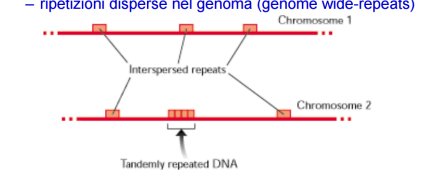


DNA RIPETITIVO

E' presente in tutti gli organismi ed in alcuni (incluso l'uomo) costituisce una frazione cospicua del genoma.

Le ripetizioni possono essere

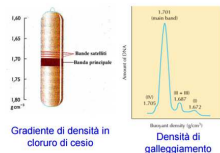
- ripetute in tandem (tandemly repeated)
- ripetizioni disperse nel genoma (genome wide-repeats)



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 alloide umano)



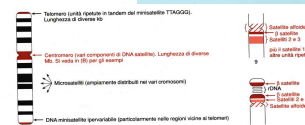
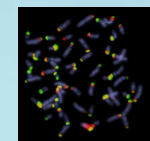
Minisatelliti
Unità lunghe fino a 25 bp
Segmenti lunghi fino a 25 kb
(es. DNA telomerico; minisat. Telomerico)
DNA minis. ipervariabile -> DNA fingerprint

Microsatelliti
Unità < 4bp
Segmenti lunghi fino 150 bp
5'-CACACACACACA-3'
Es.: nell'uomo la ripetizione CA
copre lo 0,25% del genoma

115

DNA RIPETUTO IN TANDEM O DNA SATELLITE

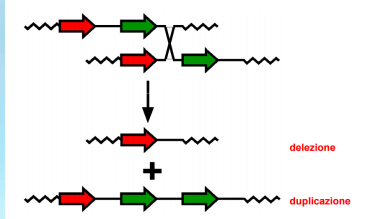
Classe	Dimensioni dell'unità ripetuta (bp)	Principale localizzazione cromosomica
DNA satellite (spesso blocchi lunghi da 100 a diverse Mb) Satelliti 2 e 3 Satellite 1 (poco in AT)	5 25-48 171 68	La maggior parte dei cromosomi (probabilmente tutti) Eterocromatina centromerica della maggior parte dei cromosomi e altre regioni eterocromatiche Eterocromatina centromerica di tutti i cromosomi In particolare l'eterocromatina centromerica dei cromosomi 1, 8, 13, 14, 15, 21, 22 e Y
DNA minisatellite (spesso blocchi lunghi da 0,1 a 20 kb) Famiglia telomerica Famiglia ipervariabile	8 9-24	Tutti i telomeri Tutti i cromosomi, spesso vicino ai telomeri
DNA microsatellite (spesso blocchi inferiori alle 100 bp)	1-4	Tutti i cromosomi



21

Origine del DNA ripetuto in tandem

Crossing Over ineguale

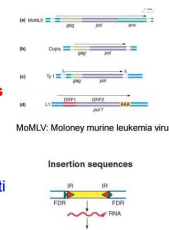


117

DNA RIPETUTO DISPERSO NEL GENOMA

interspersed genome - wide repeats

- Trasposoni ad RNA (o retrotrasposoni)**
 - molto + frequenti negli eucarioti
 - sono molto simili a retrovirus
- Trasposoni a DNA**
 - molto + frequenti nei procarioti
 - Elementi IS (es.: IS1, IS186)** sequenze d'inserzione



118

Table 9.14: Major classes of tandemly repeated human DNA

Class	Size of repeat unit (bp)	Major chromosomal location(s); transcriptional status
Satellite DNA (arrays often within 100 kb to several Mb size range)	5-171	Especially at centromeres; not transcribed
α (alphoid DNA)	171	Centromeric heterochromatin of all chromosomes
β (SatDNA family)	68	Notably the centromeric heterochromatin of 1, 9, 12, 14, 15, 21, 22 and Y
Satellite 1 (AT-rich)	25-48	Centromeric heterochromatin of most chromosomes and other heterochromatic regions
Satellites 2 and 3	5	Most, possibly all, chromosomes
Minisatellite DNA (arrays often within the 0.1-20 kb range)	8-64	At or close to telomeres of all chromosomes; vast majority not transcribed
Telomeric family	6	All telomeres
Hypervariable family	9-64	All chromosomes, often near telomeres
Microsatellite DNA (= simple sequence repeats, SSR) (arrays typically < 100 bp)	12	Dispersed throughout all chromosomes; some small arrays of very simple sequence

119

Table 9.14: Major classes of tandemly repeated human DNA

Class	Size of repeat unit (bp)	Major chromosomal location(s); transcriptional status
Satellite DNA (arrays often within 100 kb to several Mb size range)	5-171	Especially at centromeres; not transcribed
α (alphoid DNA)	171	Centromeric heterochromatin of all chromosomes
β (SatDNA family)	68	Notably the centromeric heterochromatin of 1, 9, 12, 14, 15, 21, 22 and Y
Satellite 1 (AT-rich)	25-48	Centromeric heterochromatin of most chromosomes and other heterochromatic regions
Satellites 2 and 3	5	Most, possibly all, chromosomes
Minisatellite DNA (arrays often within the 0.1-20 kb range)	8-64	At or close to telomeres of all chromosomes; vast majority not transcribed
Telomeric family	6	All telomeres
Hypervariable family	9-64	All chromosomes, often near telomeres
Microsatellite DNA (= simple sequence repeats, SSR) (arrays typically < 100 bp)	12	Dispersed throughout all chromosomes; some small arrays of very simple sequence



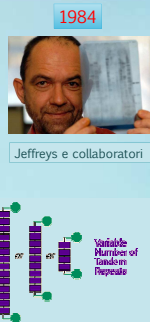
120

DNA ripetitivo: Minisatelliti

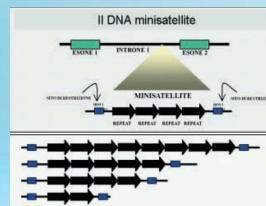
Minisatelliti o **VNTRs**: brevi sequenze (9-40 bp) di DNA vengono ripetute una di seguito all'altra (in Tandem) numerose volte

A ogni locus, il n° di ripetizioni (repeats o core) = alleli
è altamente variabile nei diversi individui

→ DNA fingerprinting



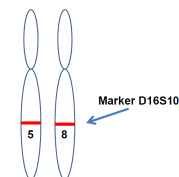
Minisatelliti e ALLELI CODOMINANTI



Locus = Marker

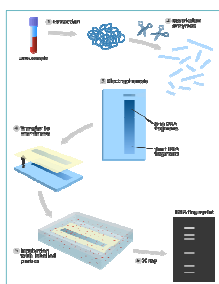
Chromosome 16

Remember: one copy from mom one copy from dad



Eredità mendeliana;
Codominanti: a ciascun locus: se gli alleli sono uguali è omozigote, se differenti sarà eterozigote

Come è stato prodotto il primo DNA fingerprinting



1. Estrazione del DNA
2. enzimi di restrizione

3. → migliaia di pezzi di DNA con una varietà di lunghezze differenti (bp) → separati secondo dimensioni (gel elettroforesi)

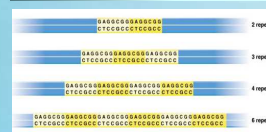
I pezzi di DNA più corti si spostano attraverso il gel più facilmente ed è quindi più veloce;

più difficile per i pezzi di DNA più lunghi di muoversi attraverso il gel e migrano più lentamente.

→ quando la corrente elettrica viene spenta, i frammenti di DNA vengono stati separati in ordine di grandezza (RFLP) e le molecole più piccole di DNA saranno più lontano dall'origine.

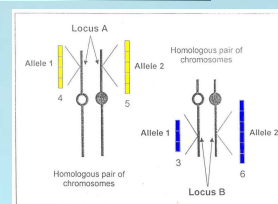
4. RFLP blotting → DNA fingerprinting

Minisatelliti e DNA fingerprinting



CORE: unità ripetuta (=repeat)

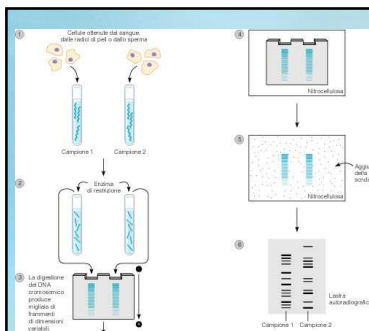
Numero di Repeats = nome dell'allele



Eredità mendeliana;
Codominanti: a ciascun locus: se gli alleli sono uguali è omozigote, se differenti sarà eterozigote

DNA fingerprinting Multilocus RFLP-VNTR

repeats	4	4	2	3	1	4	5	3
Chromosome #	Chr 8		Chr 21		Chr 7		Chr 13	
Marker Name	(D8S1179)		(D21S11)		(D7S820)		(D13S317)	
Genotype	4, 4		2, 3		1, 4		5, 3	
Or "Profile":	or "4"							



da Brooker, Genetica, ed. Zanichelli

[Southern Blot Animation](#)

Pertanto con DNA fingerprinting....

...è una tecnica che rileva *simultaneamente* molti minisatelliti nel genoma per produrre un modello unico di un individuo.

- Questa è un'impronta digitale del DNA.



- La probabilità di avere due persone con la stessa impronta DNA è molto piccola.

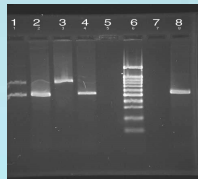
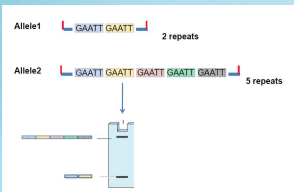
- Proprio come l'impronta digitale reale, l'impronta digitale del DNA è qualcosa con cui si nasce, è solo te.



DNA Fingerprinting Animation

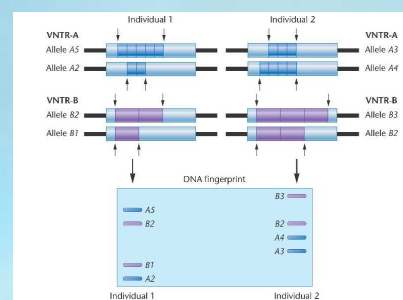
128

DNA fingerprinting Multilocus RFLP-VNTR



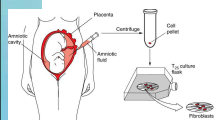
129

DNA fingerprinting Multilocus RFLP-VNTR



130

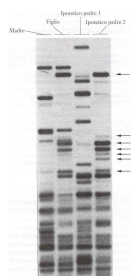
Applications: Paternity Testing



Si possono utilizzare cellule fetali:

- prelievo di **villi coriali (PVC o villocentesi)** (10-13 sett.) e comporta un prelievo di cellule della placenta.
- prelievo di **cellule fetali dal liquido amniotico (PCA o amniocentesi)** (15-18 sett.)

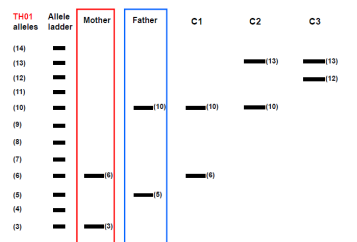
Alleged Father	Ladder	Child	Ladder	Mother
	20		20	
	19		19	
	18		18	
	17		17	
	16		16	
	15	15	15	
	14	14	14	14
	13	13	13	



131

Applications: Paternity Testing

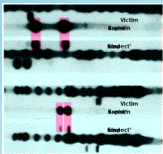
Who is the possible Biological Child?



132

Applications: sexual assault case

1986. Negli Stati Uniti viene ammessa per la prima volta in tribunale un'analisi con RFLP, in un caso di stupro (Stato della Florida contro Tommy Lee Andrews).



Sexual Assault Case



1987

L'analisi del DNA a fini forensi subisce una battuta di arresto.

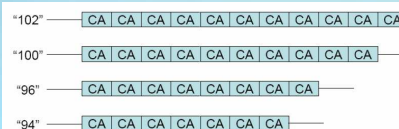
A NYC, nel processo contro Joseph Castro, la corte sceglie di rendere inammissibile l'analisi del DNA ai fini della inclusione.

DNA profiling attuale

- Si basa su microsatelliti, piuttosto che su minisatelliti
- Le ripetizioni breve tandem (STR o SSR), sono i parenti più brevi di minisatelliti e sono ripetizioni lunghe di solito da 2 a 6 bp.
- Come minisatelliti si ripetono più volte in tutto il genoma umano (es. CORE tetranucleotide : 'AATG').

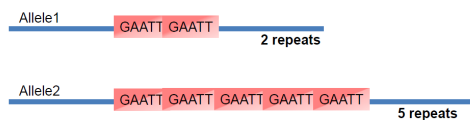
STRs (Short Tandem Repeat)s o SSRs (Simple Sequence Repeats)

Si tratta di ripetizioni di un breve motivo di base di lunghezza generalmente compresa tra 2-6 bp.

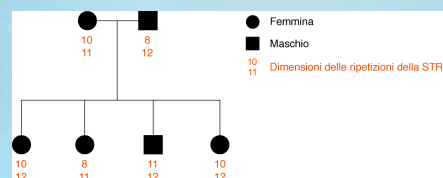


ALLELI CODOMINANTI

Number of STRs Provides Uniqueness



Example: a locus on Chromosome 10



Eredità di STRs in una famiglia

ALLELI CODOMINANTI

[illegible]

ATTUALE DIAGNOSI INDIVIDUALE e DNA-profiling
(o profilo genetico)



140

Le analisi STR sono incredibilmente sensibili quindi hanno bisogno solo una piccola quantità di DNA di qualcuno per produrre un risultato preciso.

I profili DNA utilizza la reazione a catena della polimerasi (**PCR**) per produrre molte copie di specifiche sequenze STR.



141

Various Cell Lysis Techniques			
Technique	Principle	Time of lysis	Example
Enzyme digestion	Digestion of cells will lead to osmotic disruption of cell membrane	15-30 min	Gram positive bacteria
Osmotic shock lysis	Osmotic disruption of cell membrane	<5 min	Red blood cells
Blank homogenization	Cells are forced through narrow gap leading to disruption of cell membrane	10-15 min	Liver tissue
Blade homogenizer	Large cells are broken by chopping action	5-10 min	Muscle tissue, animal tissue, plant tissue, Bacteria
Girdling with alumina powder	Cell walls are ripped off by micro particles	5-15 min	Bacteria
Girdling with glass beads	Cells are ripped off by rapid vibration of glass beads	10-20 min	Bacteria
French press	Cells are forced through small orifice at very high pressure. Shear forces disrupt cells.	10-30 min	Bacteria, plant cells
Sonication	Cell disruption by shear forces and cavitation caused by high-pressure sound waves	5-10 min	Bacteria


```

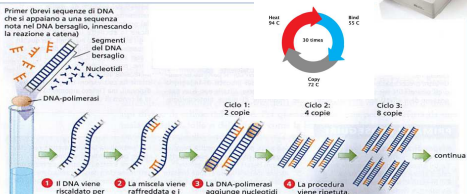
graph LR
    A[Sample Collection] --> B[DNA Extraction]
    B --> C[DNA Quantitation]
    C --> D[Amplify w/ PCR]
    D --> E[Capillary Electrophoresis]
    E --> F[Results]
    F --> G[Interpretations / Statistics]
    
    A -.->|Contamination| B
    B -.->|Contamination| C
    C -.->|Contamination| D
    D -.->|Contamination| E
    E -.->|Contamination| F
    
    B -.->|Optimum amount of DNA is 1 nanogram| C
    
```

The flowchart illustrates the steps of DNA analysis: Sample Collection, DNA Extraction, DNA Quantitation, Amplify w/ PCR, Capillary Electrophoresis, and Results. Arrows indicate the flow between steps, with dashed arrows labeled 'Contamination' showing potential cross-contamination between steps. A note indicates that the optimum amount of DNA is 1 nanogram, which is relevant to the DNA Quantitation step.

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

La reazione a catena della polimerasi (PCR)

Permette di "amplificare" un segmento di DNA.
Da un'unica molecola di DNA, in poche ore la PCR può produrre 100 miliardi di molecole identiche.

The diagram illustrates the PCR process in five numbered steps:

- Il DNA viene riscaldato per separare i filamenti.** (The DNA is heated to separate the strands.)
- La miscela viene raffreddata e i primer si legano ai filamenti.** (The mixture is cooled and primers bind to the strands.)
- Le DNA-polimerasi aggiungono nucleotidi ai filamenti prolungando così le molecole figlie.** (DNA polymerase adds nucleotides to the strands, extending the daughter molecules.)
- La procedura viene ripetuta, ripartendo dal secondo filamento.** (The procedure is repeated, starting from the second strand.)
- continua** (continues)

A circular inset shows the cycle times: **94°C** (red arrow), **55°C** (blue arrow), and **72°C** (green arrow), with a total duration of **10 min**.

Labels in the diagram include: **Primer** (Brevi sequenze di DNA che si appaiano a una sequenza nota nel DNA bersaglio, innescando la reazione a catena), **Segmenti del DNA bersaglio**, **Nucleotidi**, **DNA-polimerasi**, **Ciclo 1: 2 copie**, **Ciclo 2: 4 copie**, **Ciclo 3: 8 copie**, and **Copy 1**.

PCR

[PCR animation](#)

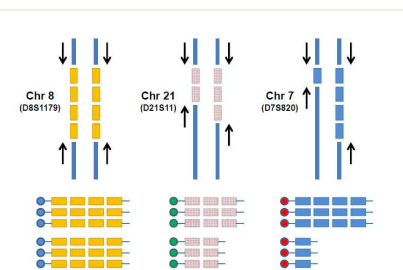
145

PCR e il DNA-profile

- PCR è una procedura automatizzata (PCR multiplex)
- Si richiede solo piccole quantità di DNA (anche da un campione di DNA che è parzialmente degradato).
- Nell'analisi STR i primers utilizzati nella PCR sono progettati per attaccare alle estremità della sequenza STR di interesse.
- Una volta abbastanza copie della sequenza sono stati prodotti mediante PCR, elettroforesi viene utilizzato per separare i frammenti in base alle dimensioni.

146

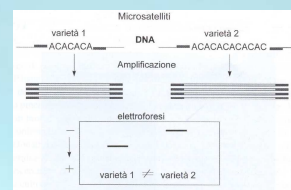
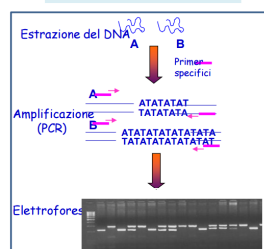
Polymerase Chain Reaction (PCR)



147

L'amplificazione di un STR darà origine a due bande se l'individuo è eterozigote un'unica banda se l'individuo è omozigote

Marcatori microsatellite



148



Table 1
Some examples for defining allele nomenclature under the various STR repeat categories.

STR repeat category	Examples with repeat region sequence and allele designation
Simple repeat	TH01: [AATC] _n = allele 7
Variant allele	TH01: [AATC] _n ATC [AATC] _n = allele 9.3
Compound repeat	vWA: [TCTA][CTG][CTCA] _n = allele 18
Complex repeat	D21S11: [TCTA][CTG] _n [CTCA] _m [TCTA] _k [TCA] _l [TCA] _j [TCCAA] _i [TCTA] _h
	CSF1PO: [GAG] _n = allele 27
	D21S11: [TCTA] _n [CTG] _m [----] [TCTA] _k TCA [TCTA] _j TCCATA [TCTA] _i
	DIS3: [GAG] _n = allele 21.2

149

Table 2
Genomic information on the twenty-four most commonly used autosomal STR loci.

STR locus	Chromosome position	Location	Strand	Allele designation	Repeat region sequence*
D1S1656	1q42	236,769,696-236,769,683	R	17	[TGA] _n [AGG] [TG] _n
TYOX	2p25.3	1,489,653-1,489,664	F	8	[AATG] _n
D2S44E	2q34	68,071,947-68,071,994	F	12	[TCTA] _n
D2S1338	2q35	218,014,859-218,014,950	R	23	[TCCG] [TTCG] [TCCG] [TTCG]
D3S1358	3p21.31	43,546,739-43,546,802	F	16	[TCTA] [TCTG] [TCTA] _n
FGA	4q31.3	154,587,736-154,587,823	R	22	[TTCG] [TTTG] [TTCG] [TTTG] [TTCG] [TTCG] [AGAT] _n
D5S818	5q21.2	123,775,556-123,775,569	R	11	[AGAT] _n
CSF1PO	5q31.1	150,076,324-150,076,375	F	13	[ATCT] _n
SECT	6p24	88,277,144-88,277,245	R	25.2	[AAAG] _n AG [AAAG] _n AG [AAAG] _n AAAAG [AAAG] _n G AAGG [AAGG] _n AG
DIS1843	6q15	91,746,225-91,746,272	R	12	[AGAT] _n
TH02	7p21.1	84,160,236-84,160,277	F	13	[GAT] _n
D8S1729	8p24.13	124,894,865-124,894,916	F	13	[TCTA] [TCTG] [TCTA] _n
D10S1248	10q26.3	129,294,244-129,294,265	F	13	[GGA] _n
TH01	11p15.5	2,711,086-2,711,115	F	7	[AATG] _n
vWA	12p11.31	5,383,957-5,384,044	R	17	[TCTA] [TCTG] [TCTA] _n TCCA TCTA
D12S181	12p11.2	12,297,020-12,297,065	F	19	[AGAT] _n [AGAC] _n [AGAT]
D12S17	12p11.3	83,148,051-83,148,068	F	17	[ATC] _n [AATG] _n
Penta E	15q26.2	96,831,015-96,831,039	R	5	[AAAG] _n
D16S539	16p4.1	86,512,702-86,512,745	F	11	[GAT] _n
D18S51	18q21.33	63,281,667-63,281,738	F	18	[AGAA] _n
D19S433	19q13	29,626,235-29,626,268	R	14	[AGAG] AAGAG AAGG TACG [AAGG] _n
D21S11	21q21.1	19,381,973-19,382,099	F	29	[TCTA] [TCTG] [TCTA] _n [ATCTCA] _n TCA [TCTA] _n TCCATA [TCTA] _n
Penta D	21q22.3	43,636,260-43,636,269	F	13	[AAAG] _n
D22S1045	22q12.3	37,940,287-37,940,337	F	17	[ATT] _n ACT [ATT] _n

* Nucleotides in bold are not counted toward the allele designation.

150

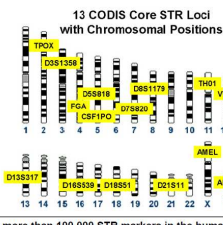
Condizioni di PCR per amplificare gli STRs

Name	Chr	PCR amplification primers	PCR product size	PCR conditions
1-TPOX	2	F: CACTGACGACCACGAAGCTGG R: CCTTTCAGCTGCTTATTTCGCC	126 bp (102-138)	
3-OPS1358	3	F: AACTGACGTCGAATCTGGT R: F: AACTGACGACGAAGGCTC	127 bp (99-147)	
3-5FGL4	4	F: CCGGCTAGATGTTTGAACCTA R: TGGATCTGCTTAATGATGATG	192 bp (158-214)	
4-OSM818	8	F: GGGGTATTTCTCTCTTTGGT R: TGGATGCAATCAACGATG	157 bp (133-169)	
5-CSPF-10	5	F: AACTCGATGCTGCGAAGGATGAC R: CATTTCTGTGACAGGACGTTCTC	202 bp	
6-OSM780	7	F: TGTGATCTTATAGACAACTAAGG R: CTGAGATCTCAAAACACTGGAAG	222 bp (194-234)	
7-OMB1179	7	F: TGTGATCTTATAGACAACTAAGG R: CTGATGATATAAATGATCTCATTTA	177 bp (157-203)	
8-HMH701	11	F: GGGCTGCAAAAGCTGATGATG R: GTGATCTCCATGGGCTCTGATG	177 bp (146-190)	
9-HUMWA	6	F: CCTTGCTGGATGATGAGATATCATGATG R: GCGACATGCAATAATCACTAGGATGGTGG	154 bp	
10-135P317	13	F: AACTGACGCTGGGATGATGATG R: GCGCAAAAGACAGACAGAA	177 bp (157-203)	
11-D165539	18	F: GATCGCAAGCTCTCTCTCTCT R: AGCTTGTGTGGTGCATCTGT	144 bp (141-173)	
13-OD2151	21	F: ATATGATGCGAATCTCCGACAG R: TGTATGCAATGATCTCTTCAC	205 bp (202-206)	
14-Amelogenin, X, Y		F: CCTGGGCTGCTGTAAAGATATGTTG R: CCGGCTGCTTAAGCTGATGATG	106/112	55° C 1 min 30 s

55 • C T annealing e 1.5 mM MgCl₂

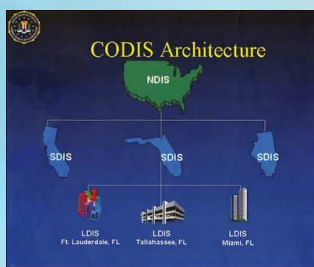
STR Loci in Modern Forensics

Combined DNA Indexing System



There are more than 100,000 STR markers in the human genome

CODIS Architecture



Combined DNA Indexing System (CODIS)

National DNA Index (NDIS)

State-based DNA Index System (SDIS)

Local (LDIS)	DNA	Index	System
--------------	-----	-------	--------

Combined DNA Index System

Source of Profiles Stored in CODIS (indexes):

- Arrestee STR profiles (Statute)
- Convicted offender STR profiles
- Forensic sample profiles (Single and Mixtures) attributable to crime scene or potential unknown perpetrator (STR)
- Missing person profiles (STR, YSTR, and Mitochondria)
- Relatives of missing persons (STR, YSTR, and Mitochondria)
- Unidentified human remains (STR, YSTR, and Mitochondria)

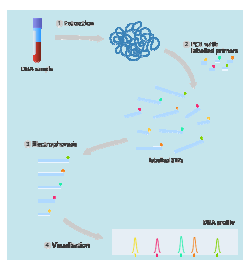
Combined DNA Index System

Year	# Convicted Offenders	Forensic Samples
2000	460,365	22,484
2001	750,929	27,897
2002	1,247,163	46,177
2003	1,493,536	70,931
2004	2,038,514	93,956
2005	2,826,505	126,315
2006	3,977,433	160,582
2007	5,287,505	203,401
2008	6,398,874	248,943
2009	7,688,286	298,369
2010	8,646,417	328,067
2011	9,404,747	361,176
2012	9,761,000	436,900

PCR e DNA-profile oggi...

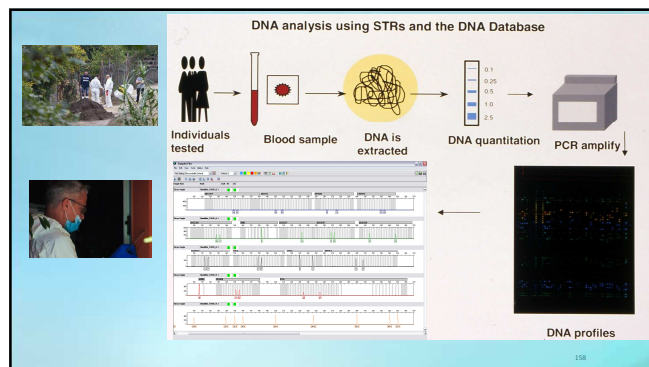
- I primers per ogni STRs possono essere etichettati con una specifica fluorescente.
- Questo rende più facile identificare e registrare le sequenze STR dopo PCR.
- Ogni frammento amplificato con PCR passa da un laser che induce i frammenti con tag fluorescenti a brillare di un colore specifico.
- L'uscita viene visualizzata come una serie di picchi colorati evidenziando il colore e la lunghezza di ogni sequenza STR.

Multiplex PCR

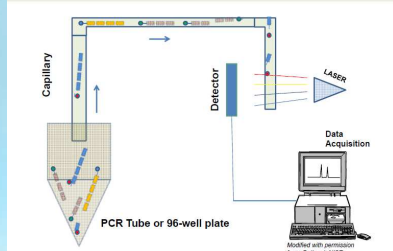


- 16 Loci contemporaneamente
- sensibilità < 0.5 ng di DNA
- Campioni misti e/o degradati
- Non c'è sovrapposizione di bande

- 0.1µl blood stain on denim
- 1/5 of eluted material used for amplification



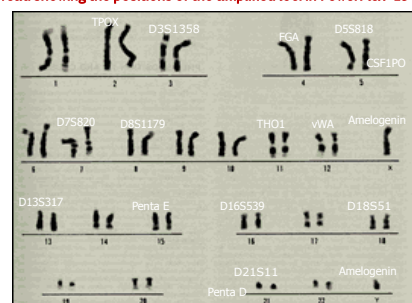
Capillary Electrophoresis (CE)



Chromosome Spread showing the positions of the amplified loci in PowerPlex®16

The PowerPlex® 16 System amplifies 16 loci.

Combined DNA Indexing System



Current Forensic STR Multiplexes

PowerPlex 16

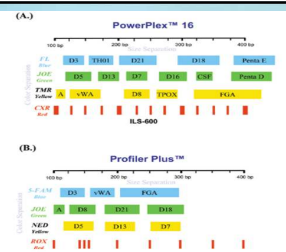
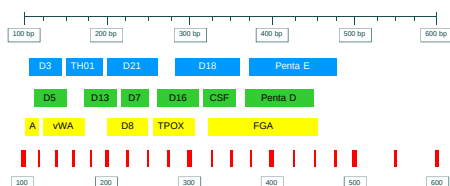
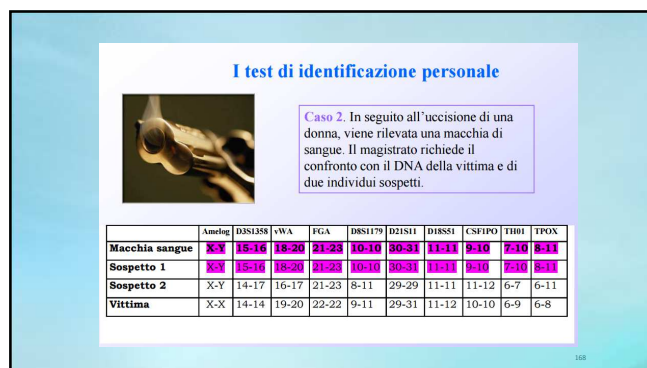
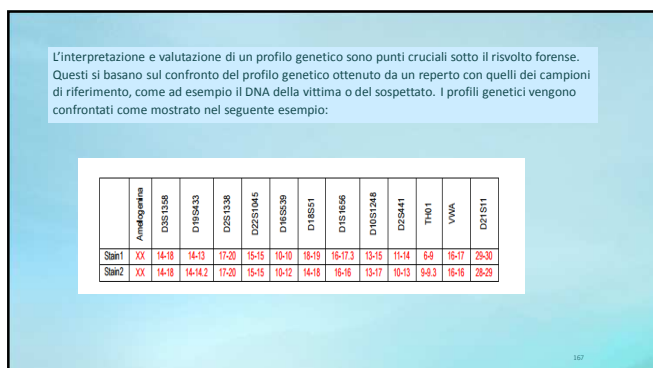
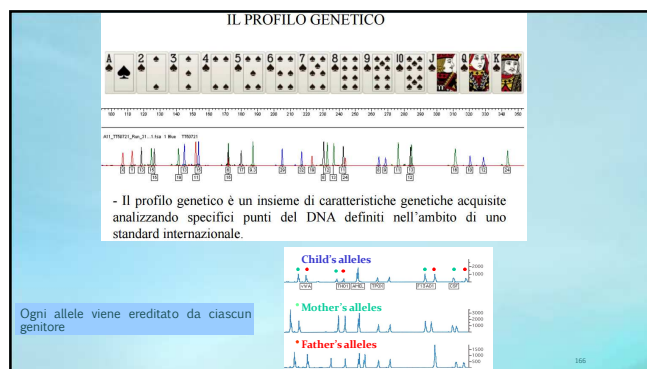
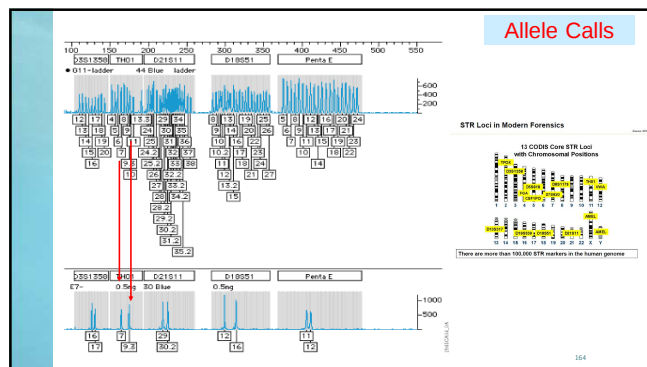
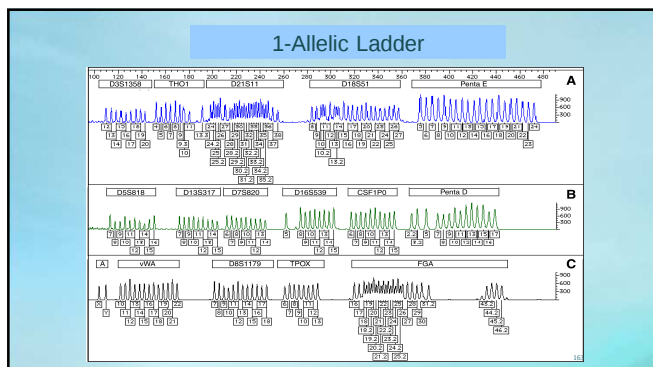


Figure 3. Schematic representation of the STR loci included in two commercially available multiplex amplification kits: (A) PowerPlex™ 16 kit from Promega Corporation and (B) Profiler Plus™ kit from Applied Biosystems. The size range for known alleles is represented by the length of the box containing the locus name. The vertical position of the box reflects the dye color used to label the amplification products. The two kits shown use three different fluorescent dyes that are spectrally distinguishable and colored blue, green and yellow for detection. Different internal sizing standards are available and labeled with a red-colored dye. Each locus box is hyperlinked to the appropriate fact sheet.



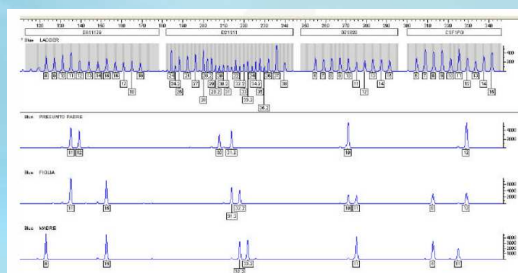
Il test di paternità

Caso 1. Nel corso di una separazione, il marito sostiene di non essere il padre biologico del bambino. Il giudice chiede che venga eseguito il test di paternità.



	Ameteg	D3S1358	vWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	CSF1PO	TH01	TPOX
Madre	X-X	14-15	17-17	19-20	8-10	28-28	9-10	9-9	8-10	6-6
Figlio	X-Y	15-16	16-17	19-23	8-8	28-29	10-11	9-10	7-10	8-6
Padre	X-Y	16-17	16-18	23-29	8-11	29-29	11-11	10-12	6-7	7-8

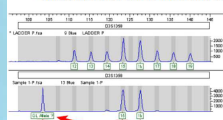
169



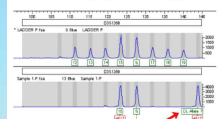
170

Out of ladder (OL) alleles

- Alleles that are less than the lowest allele on the specific ladder are reported as "less than X."



- Alleles that are greater than the largest allele on the specific ladder are reported as "greater than X."



171

DNA Use in Forensic Cases

- La maggior parte sono casi di stupro (>2 out of 3)
- Ricerca di corrispondenze tra prove, vittima, e sospetto
- Si devono confrontare i profili DNA**

Le sfide

- miscele tra DNA
- DNA è spesso degradato
- spesso vi sono inibitori di PCR
- contaminazione dei campioni

172

DNA forense (fDNA)

Il può essere definito come qualsiasi materiale genetico ottenuto da campioni con le seguenti caratteristiche principali:

- non costituiti da prelievi biologici effettuati da individui vivi,
- rappresentati da tracce di origine biologica come sangue, sperma, saliva, urina o cellule epiteliali raccolte sulla scena del crimine;
- non sottoposti immediatamente ad analisi genetica;
- non conservati immediatamente ad una temperatura inferiore a -20°C

173

Reazioni biochimiche di modificazioni del fDNA

Principali modificazioni chimiche del fDNA:

- Idrolisi del legame N-glicosidico coinvolge la rottura del legame tra il C1 del desossiribosio e la base azotata (→nel DNA si ha la formazione di un sito apurinic/apirimidinic (AP).
- Fenomeno di "jumping PCR", cioè, quando la Taq polimerasi trasla, o salta, da un filamento di DNA danneggiato all'altro→ generati alleli "chimera" artificiali, diversi da quelli attesi del campione biologico originale [Pääbo S. et al.,1990]. In corrispondenza di questi ultimi, la Taq polimerasi, potrebbe incorporare il nucleotide sbagliato [Hofreiter M. et al., 2001].
- Idrolisi del legame fosfodiesterico tra il C2 del desossiribosio ed il C3 del nucleotide successivo determina la rottura del dsDNA.
- →frammentazione della molecola di DNA.
- Il danno ossidativo, provoca la modificazione delle basi azotate mediante la loro la deaminazione, ossia, la perdita del gruppo amminico, promosso dal perossido d'idrogeno e dai radicali liberi dell'ossigeno [Pääbo S. et al., 2004].

174

Reazione Biochimica	Modificazione del DNA – effetto sulla PCR
Idrolisi del legame N-glicosidico	Siti Apurinici - Apirimidinici (AP) Frammentazione del DNA - Incorporazione errata delle basi
Idrolisi del legame fosfodiester	Frammentazione del DNA
Deaminazione ossidativa	Incorporazione errata delle basi - Filamento di DNA non amplificabile
Deaminazione idrolitica	Incorporazione errata delle basi
Prodotti di Maillard	Filamento di DNA non amplificabile
Dimero di timina e prodotti da raggi UV	Filamento di DNA non amplificabile
Prodotti della formaldeide	Filamento di DNA non amplificabile

Tab. 2 Reazioni di modificazione del DNA con i rispettivi effetti sulla reazione di PCR.

L'analisi di quantità così limitate di DNA viene chiamata Low Copy Number (LCN) DNA typing [Gill P. et al., 2000].

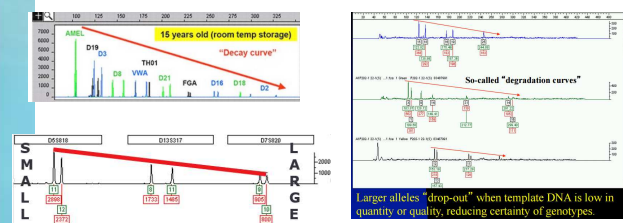
In queste condizioni, si verificano variazioni stocastiche in reazioni di amplificazione (PCR) differenti (dello stesso campione) che producono risultati di replicazione diversi:

→ **profili genetici instabili**

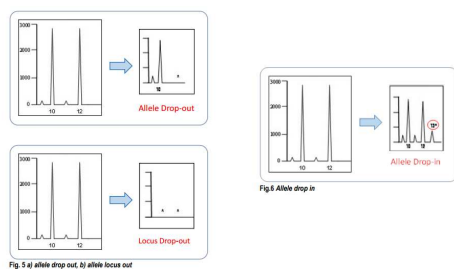
PROFILI GENETICI INSTABILI

1. Degradation DNA (fDNA)
2. Allelic dropout (LCN)
3. False peaks (stutter, blobs, spikes)
4. Mixtures

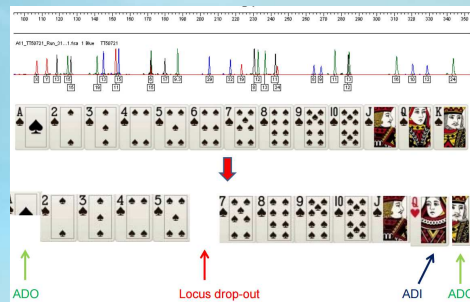
DNA degradato



Artefatti di polimerizzazione



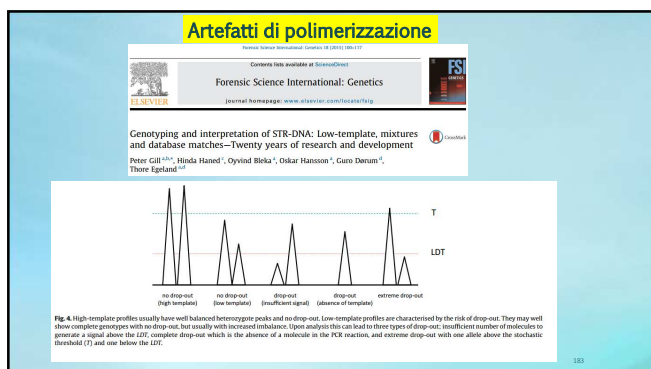
Artefatti di polimerizzazione



Sample quality			
Low quality or quantity of DNA	In heterozygous individuals, amplification of only one allele	Allelic dropout	2,10,88
Low quality or quantity of DNA	In heterozygous individuals, preferential amplification of the shorter allele	Short allele dominance (preferential long allele dropout)	85,89,90,91
Contamination of the DNA extract	Amplification of a contaminant allele	Mistaken allele	92
Low extract quality	No restriction (or less restriction) or amplification that is due to inhibitors	Allelic dropout	2,23,91,93,94
Biochemical artefacts and equipment			
Low quality reagents	No restriction (or less restriction) or amplification that is due to inhibitors	Allelic dropout; mistaken allele	NR
Low quality reagents	Poor fragment labelling and detection	Allelic dropout; mistaken allele	NR
Poor equipment precision or reliability	Examples include stochastic pipetting, evaporation during PCR, and poor fluorescent label detection	Allelic dropout; mistaken allele	NR
Taq polymerase errors	Slippage in the first steps of the PCR	False allele	10,95,96,97
Taq polymerase errors	Incomplete addition of extra adenine residues at the 3' end of amplified fragments	False allele	19,20
Lack of specificity	Amplification of non-specific products that is due to annealing of the primer to another locus	Mistaken allele	91
Lack of specificity	Non-specific restriction reactions	Mistaken allele	98
Electrophoresis artefact	Inconsistency of allele size between different experiments, devices or studies (for example, capillary versus manual electrophoresis or fluorescence versus radioactive detection)	Size homoplasy of different alleles; mistaken allele	22,69,99,100

Human factor			
Sample manipulation	Confusion between samples (for example, mislabeling or tube mixing)	Mistaken allele(s)	41
Experimental error	Contamination with an exogenous DNA or cross-contamination between samples	Mistaken allele(s)	103,104,105
Experimental error	Use of an inappropriate protocol (for example, reactant not added; incorrect T_m , primers or concentration of reactants)	Allelic dropout; mistaken allele(s)	NR
Data handling	Misreading of the profile or misidentification of the fluorescence peak	Mistaken allele	3,6,41,104
Data handling	Miscopying or confusion of the genotypes in the database	Mistaken allele	6,106,107
Data handling	Computing data (for example, bug in the database or analysis program)	Mistaken allele	NR

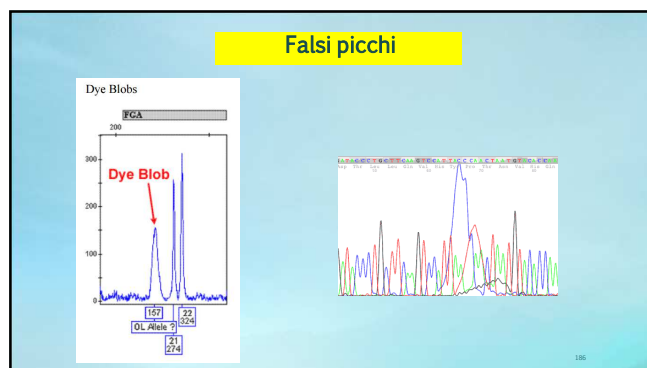
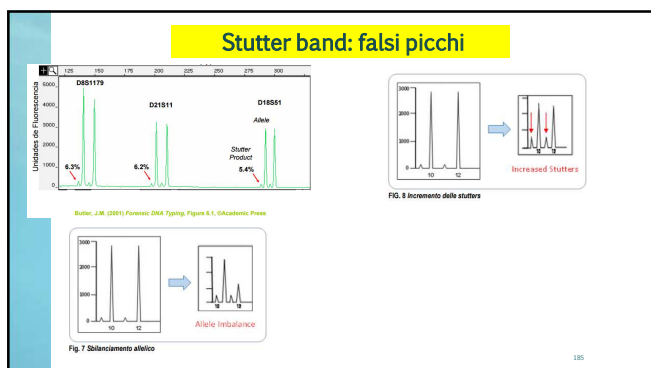
AFLP: amplified fragment-length polymorphism; false allele, allele-like PCR-generated artefact¹⁰; null allele, a non-amplifying allele that is due to a mutation in the primer target sequence¹¹; allelic dropout, the stochastic non-amplification of an allele, that is, amplification of only one of the two alleles present at a heterozygous locus¹²; mistaken allele, an allele that does not correspond to the true allele, excluding the null allele, allelic dropout and false allele. NR, not reported in the literature to our knowledge, but widely recognized; T_m , melting temperature.

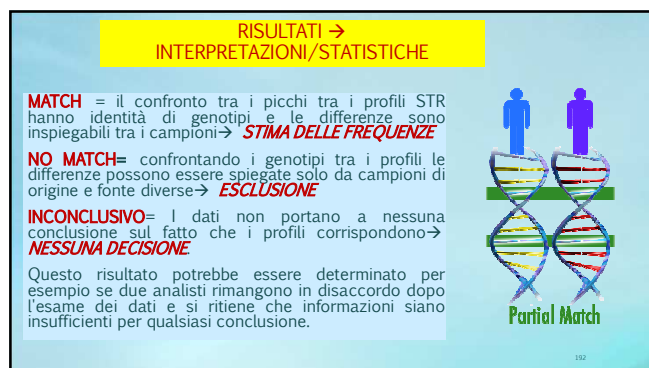
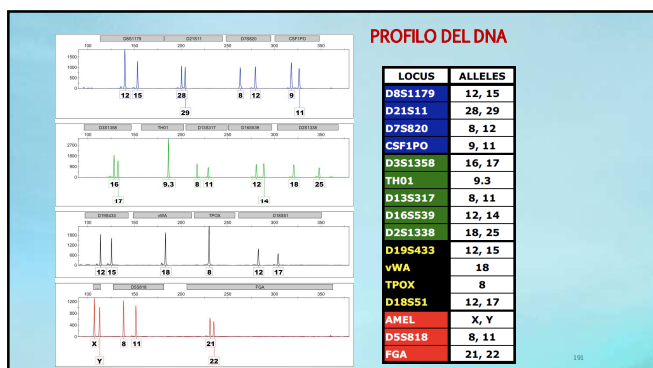
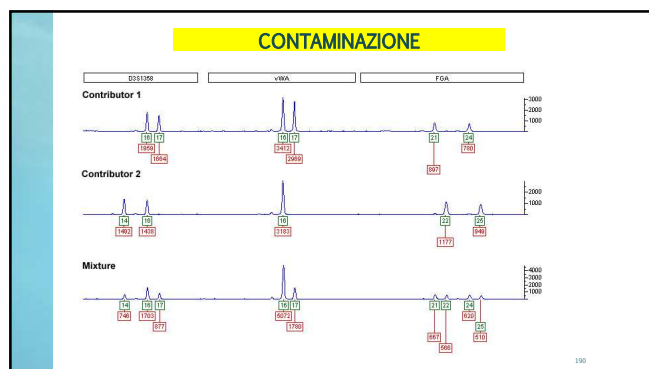
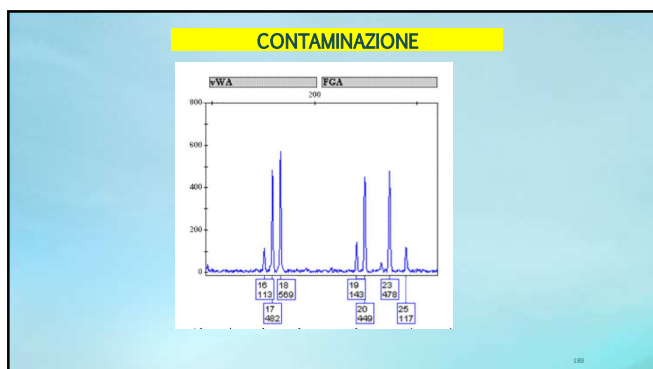
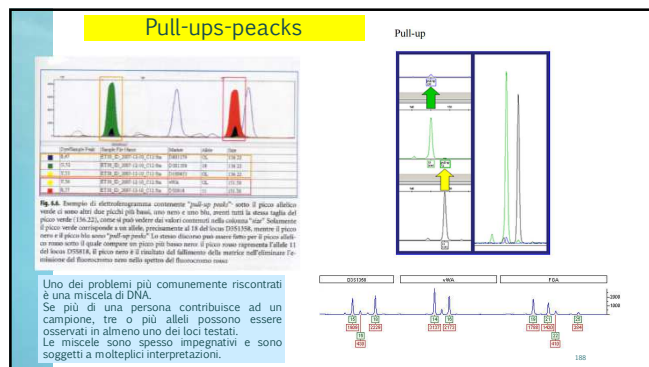
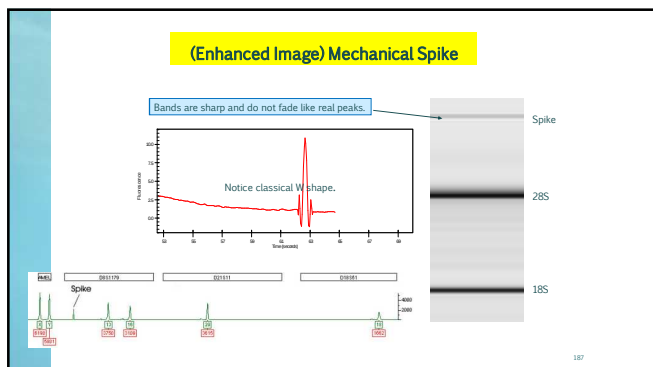


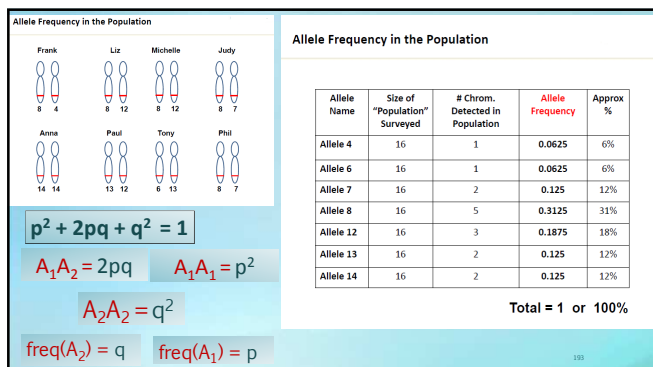
Stutter band: falsi picchi

Stutter as it correlates to unit size (eg the number of bases in a single repeat)

- Very bad with small size- di-nucleotide repeats.
- Not as bad with larger size - tetra and penta nucleotide repeats
- (dinucleotides > tri- > tetra- > penta-)







La probabilità di match: "la regola del prodotto"

o Il peso di una corrispondenza (match) tra un profilo di DNA ed un sospetto è quantificato tramite la "probabilità di match", ovvero:

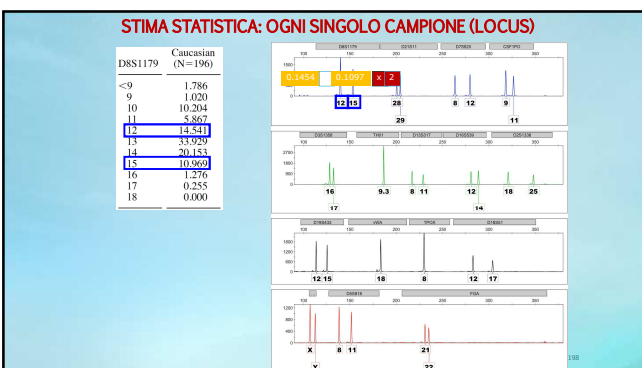
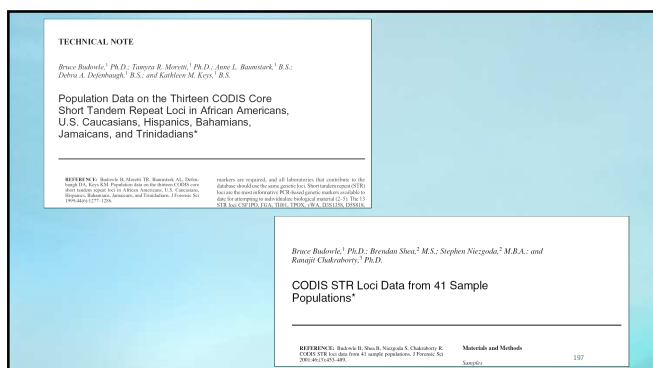
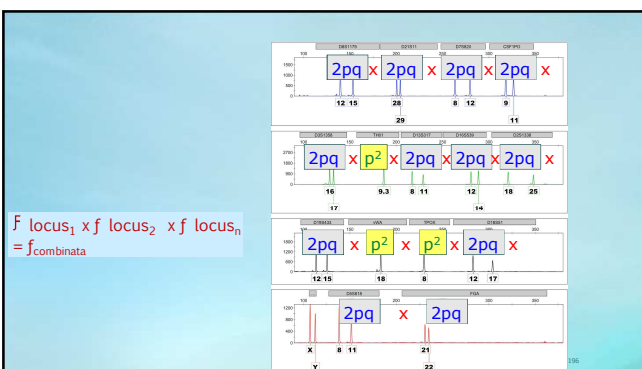
Qual è la probabilità che un profilo come quello creato a partire dal materiale biologico (traccia) rinvenuto corrisponda ad un individuo della popolazione?

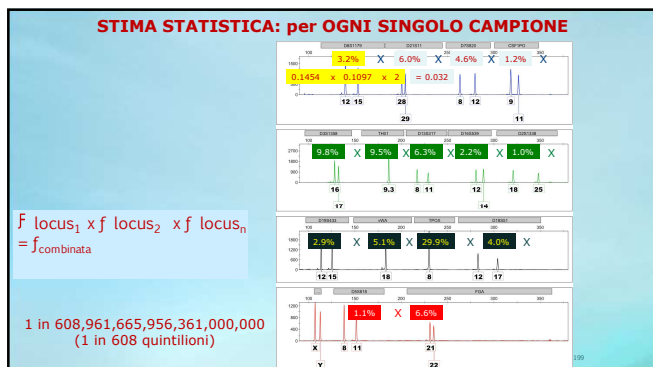
→ Si applica la regola statistica del prodotto per eventi indipendenti

Regola del prodotto

La frequenza $f_{\text{combinata}}$ di un profilo STR multi locus (DNA profile) è uguale al prodotto delle frequenze del genotipo ad ogni locus

$$f_{\text{locus}_1} \times f_{\text{locus}_2} \times f_{\text{locus}_n} = f_{\text{combinata}}$$





Match probability depends on many factors, including

- The number of loci in the DNA profile.
- Mutation rates.
- Population history.

RMP $\pm 10^{-15}$

DNA Profile		Allele frequency from database			Genotype frequency for locus	
Locus	Alleles	times allele observed	size of database	Frequency	formula	number
CSF1PO	10	109	432	$p = 0.25$	$2pq$	0.10
	11	134		$q = 0.31$		
TPOX	8	229	432	$p = 0.53$	p^2	0.28
	8					
TH01	6	102	432	$p = 0.24$	$2pq$	0.07
	7	64		$q = 0.15$		
vWA	16	91	432	$p = 0.21$	p^2	0.05
	16					
				profile frequency=		0.00014

RMP

$$f_{\text{locus}_1} \times f_{\text{locus}_2} \times f_{\text{locus}_n} = f_{\text{combined}}$$

201

locus	alleles	genotypes
D3S1358	8	36
vWa	8	36
FGA	12	78
D8S1179	9	45
D21S11	14	105
D18S51	12	78
D5S818	6	21
D13S317	7	28
D7S820	8	36

G = m(m+1)/2

m=omozigoti
m(m-1)/2= eterozigoti

Per il locus D3S1358
G= 8 (8+1)/2=72/2=36
Di cui:
Omozigoti: 8
Eterozigoti: 8 (8-1)/2= 56/2=28

36×36×78×45×105×78×21×28×36=
7.89 X 10¹⁴

← Ognuno di noi ha un determinato genotipo

DNA Mixtures: A Separation Problem

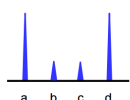
- Multiple people combine their DNA
- Laboratory biological separation *extract DNA, amplify, electrophorese*
- Computer data separation *infer each person's genotype*

modified Random Match Probability

By definition, the RMP is calculated on a single-source profile, so for a mixture sample, ... this approach is often called a 'modified' RMP (mRMP)." (Butler 2014)

Statistical Approaches with Mixtures

- **Random Match Probability (RMP)** – The major and minor components can be successfully separated into individual profiles. A random match probability is calculated on the evidence as if the component was from a single source sample.



$$\begin{aligned} \text{RMP}_{\text{minor}} &= 2pq \\ &= 2 \times f(b) \times f(c) \end{aligned}$$



295

Partendo da due domande chiave:

c'è compatibilità tra il profilo genetico del sospettato con quello della traccia (scena crimine):

- 1) qual è la probabilità che tale *individuo pur essendo innocente* sia colpevole (Hp dell'accusa) ?
- 2) qual è la probabilità tale individuo sia realmente innocente (Hp della difesa) ?

296

LR (likelihood ratio), ovvero un rapporto di probabilità, vengono tipicamente confrontate le ipotesi dell'accusa e della difesa. Il risultato ottenuto indica quanto è più probabile un'ipotesi rispetto all'altra.

$$\text{LR} = \frac{H_p \text{ (ipotesi dell'accusa)}}{H_d \text{ (ipotesi della difesa)}}$$

Se il risultato è > 1 , l'ipotesi è favorevole all'accusa
 Se è uguale a 1, l'ipotesi è neutra
 Se è < 1 , l'ipotesi è a favore della difesa

Value of likelihood ratio	Verbal equivalent
> 1-10	Weak support for proposition
10-100	Moderate support
100-1000	Moderately strong support
1000-10,000	Strong support
10,000-1,000,000	Very strong
> 1,000,000	Extremely strong

^a Association of Forensic Science Providers. Standards for the formulation of evaluative forensic science expert opinion. Science and Justice 49 (2009) 161-164

297