 SCENZALAB	A. S. 2009/ 2010	RELAZIONE N°
<u>GRUPPO: n°</u>	<u>DATA:</u>	<u>CLASSE:</u>
_____ _____ _____ _____ _____ _____	Finger printing	

MATERIALE OCCORRENTE:

Materiale contenuto nel Kit 130

- A DNAMarkers Standard
- B Campione di DNA rinvenuto sulla scena del crimine (preamplificato in PCR)
- C Campione di DNA del sospetto 1
- D Campione di DNA del sospetto 2
- E Campione di DNA del sospetto 3

Materiale aggiuntivo da preparare

- Apparato per elettroforesi (cella)
- Alimentatore
-
- Bilancia *
- Piastra riscaldata, bunsen o microonde*
- Guanti e occhiali di sicurezza
- Pipettatore
- Beakers o beuta da 250 ml*
- Guanti termici*
- Vaschetta (per la decolorazione)
- Acqua deionizzata o distillata

* solo per preparazione gel per corsa elettroforetica

N°	DENOMINAZIONE STRUMENTI	SENSIBILITA'	PORTATA
	Micropipettrici con puntali	1 μ	5 - 50 μ
	Bilancia	0,1 g	300 g
	Apparato per elettroforesi (cella)		2 gel 7x7 cm
	Alimentatore	---	Per 2 celle standard 7x7 cm

PROCEDURA DI SICUREZZA

NORME DI SICUREZZA DI LABORATORIO

1. Guanti e occhiali di protezione devono essere sempre indossati per una buona pratica di laboratorio
2. Esercitate la massima cautela quando state lavorando con materiale che è utilizzato insieme a reagenti riscaldati e/o fondenti.
3. NON PIPETTATE CON LA BOCCA, USATE IL PIPETTATORE.
4. Dovete aver cautela quando in laboratorio usate del materiale elettrico
5. Lavatevi sempre le mani con acqua e sapone dopo aver toccato reagenti o materiale biologico in laboratorio.

N.B. i materiali utilizzati per questa esperienza possono essere smaltiti nel lavandino perché non contengono rifiuti speciali.

PROCEDURA DI ESECUZIONE DELL'ESPERIENZA:

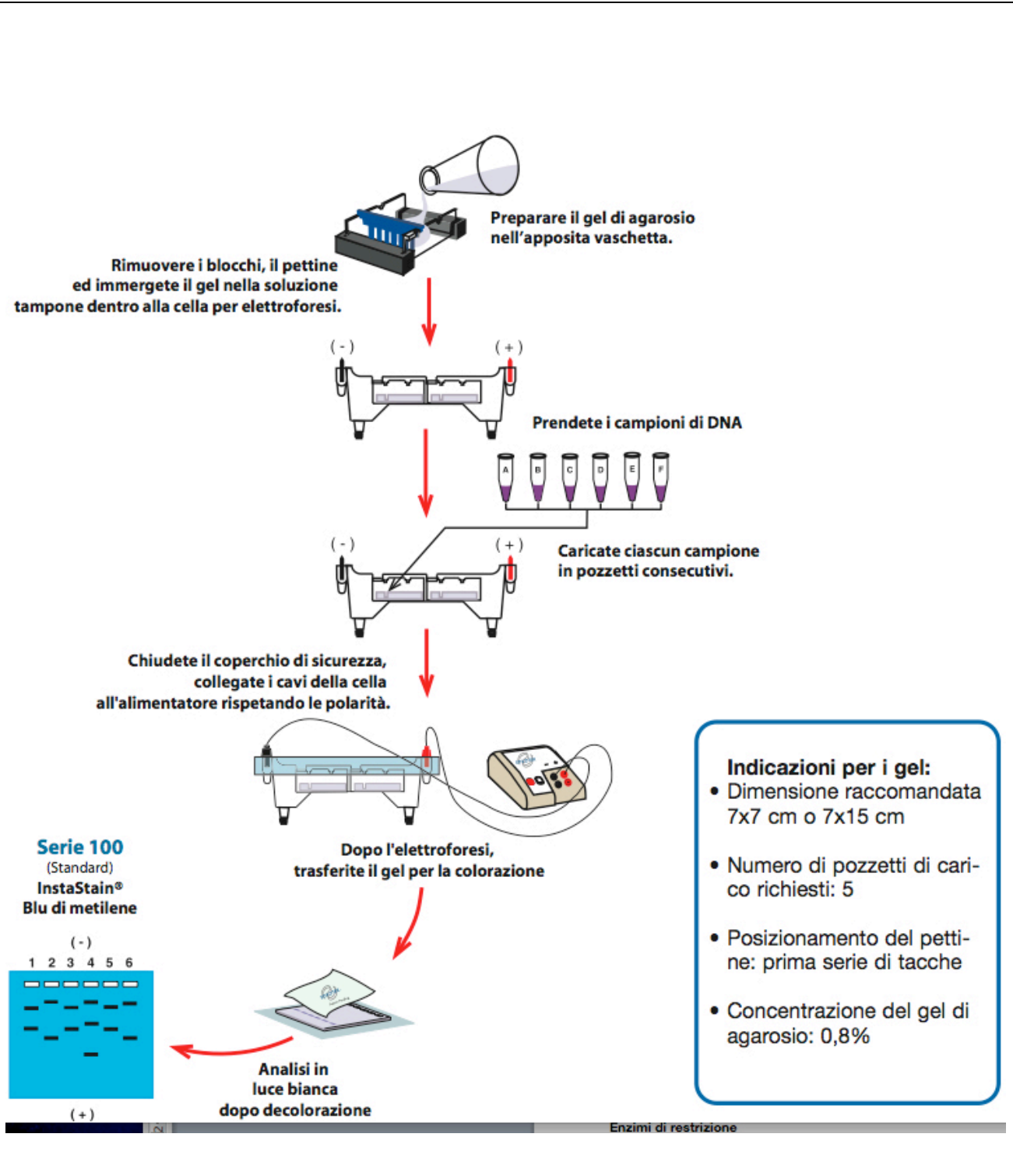
L'obiettivo di questo esperimento è quello di simulare un'analisi del DNA (analisi biologica con valore giuridico) utilizzando campioni in precedenza amplificati con tecnica PCR. In questo esperimento i campioni sono stati anche precedentemente tagliati con enzimi di restrizione.

In questo esperimento un ipotetico campione di DNA ricavato da un capello rinvenuto sulla scena del crimine è stato amplificato la reazione PCR (polimerase chain reaction). Si sottoporranno ad elettroforesi questo campione di DNA per poterlo comparare con i campioni di DNA di due sospettati al fine di determinare quella dei due era presente sulla scena del crimine.

Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio è comunemente usata per analizzare le dimensioni dei frammenti di restrizione dopo digestione con endonucleasi. Il gel di agarosio è costituito da una matrice attraverso la quale i frammenti di DNA possono migrare. I frammenti di DNA sono caricati nei pozzetti del gel. Il DNA essendo caricato negativamente migra verso il polo positivo della camera di elettroforesi. I frammenti sono separati in base alla loro carica, dimensione e forma, poiché i frammenti di digestione sono lineari la loro separazione avviene solo in base alle dimensioni. Poiché la proporzione tra massa e carica è la stessa. Il frammento con dimensioni minori è quello che si muove più velocemente. Dopo la corsa elettroforetica, il DNA può essere visualizzato attraverso colorazione. Gli enzimi di restrizione tagliano piccole molecole di DNA come i plasmidi oppure i virus, il risultato del taglio è una sequenza di frammenti di diverse dimensioni sul gel di elettroforesi. Il taglio di una grossa quantità di DNA come l'intero patrimonio genetico di un individuo da origine ad una quantità elevata di bande di diversa lunghezza.

PROCEDURA DI ESECUZIONE DELL'ESPERIENZA:



ANALISI DEI DATI SPERIMENTALI RACCOLTI

Inserire foto dell'esperimento con didascalia che descrive i vari passaggi

RELAZIONE CONCLUSIVA DELL'ESPERIENZA E PRESENTAZIONE DEI RISULTATI FINALI

Il **DNA fingerprinting** cioè l'impronta genomica (anche chiamata analisi del profilo del DNA) è una tecnica per caratterizzare il profilo del DNA di un singolo individuo analizzando le dimensioni dei frammenti di restrizione del DNA genomico ottenuti per elettroforesi mediante enzimi di restrizione.

Rispetto ad altre metodologie convenzionali utilizzate per l'analisi dei campioni di DNA come la tipizzazione del gruppo sanguigno l'analisi del DNA con enzimi di restrizione risulta essere più accurata e adatta alla pratica forense.

L'identificazione di variazioni nella sequenza di DNA (che caratterizzano il genotipo dei singoli individui) possono essere eseguite utilizzando enzimi di restrizione. Gli enzimi tagliando sequenze di DNA specifico e danno luogo a frammenti di DNA di differenti dimensioni a seconda dell'individuo. Queste sequenze sono chiamate RFLPs (restriction fragment length polymorphism). Gli RFLPs sono l'espressione del profilo genetico di ogni singolo individuo (o DNA fingerprinting).

Enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi che catalizzano il taglio dei legami fosfato. Questi enzimi richiedono per la loro attività la presenza di magnesio e il taglio di questi enzimi genera al 5' un gruppo fosfato e al 3' un gruppo idrossile nella catena di DNA. La caratteristica delle endonucleasi di restrizione rispetto alle endonucleasi generiche è che queste sono in grado di riconoscere e tagliare una specifica sequenza di DNA. Gli enzimi di restrizione sono prodotti da una serie di microrganismi diversi, almeno 3000 enzimi di restrizione sono stati identificati e catalogati. Gli enzimi di restrizione prendono nome dagli organismi da cui sono stati isolati.

Solo alcune specie di questi batteri sono in grado di produrre questi enzimi di restrizione quindi il nome di questi enzimi deriva dal genere e dalla specie del microrganismo di provenienza. Il numero romano invece indica il numero riferito al singolo enzima di restrizione. Gli enzimi di restrizione tagliano la doppia elica di DNA, non sono in grado di tagliare DNA a singola elica.

PCR

Attualmente per analizzare il DNA è utilizzata la tecnica della PCR. Questa tecnica richiede per l'analisi una quantità di DNA minore ed è sia più semplice che più rapida da eseguire. La reazione di PCR (polimerase chain reaction) è una tecnica che si basa sull'amplificazione del DNA. Il DNA è replicato da una particolare taq polimerasi purificata dal microrganismo *Thermos aquaticus*. Questa particolare taq è stabile a temperature elevate, intorno ai 95 °C. La reazione di amplificazione contiene il DNA stampo da amplificare e la taq, due oligonucleotidi sintetici (frammenti di DNA di una 20 di paia di basi circa che permettono l'innesco della reazione di amplificazione) e dNTPs (desossiribonucleotidi), un tampone specifico per il corretto funzionamento della taq. Il primo passaggio della PCR consiste nella denaturazione del DNA (i due filamenti appaiati della doppia elica di DNA sono separati), questo avviene ad una temperatura ottimale di 94°C la taq rimane stabile ed inattiva in questo passaggio.

Il secondo passaggio conosciuto come annealing consiste nell'appaiamento dei due oligonucleotidi (ibridazione), ognuno su di un singolo filamento di DNA, questa reazione avviene a circa 40- 60 °C a seconda della lunghezza dei due oligonucleotidi. Il terzo passaggio consiste nell'amplificazione del DNA bersaglio (DNA extension) in pratica la taq polimerasi si lega ai oligonucleotidi appaiati ai singoli filamenti di DNA bersaglio e comincia ad aggiungere nucleotidi complementari allo stampo. Questa reazione avviene ad una temperatura ottimale di 72 °C.

Questi tre passaggi sono ripetuti dalle 20-40 volte in base alla lunghezza del frammento bersaglio e sono chiamati cicli di amplificazione. Lo strumento utilizzato per la reazione di PCR è chiamato termociclatore. La soluzione contenente taq DNA oligonucleotidi e tamponi adeguati a far svolgere la reazione insieme ai dNTPS (nucleotidi che servono alla taq per replicare il DNA), è preparata e poi posizionata nel termociclatore il quale a seconda del programma impostato fa variare la temperatura della soluzione in modo che possa avvenire la reazione di amplificazione. La PCR in biologia forense può essere utilizzata per amplificare i polimorfismi del DNA. I polimorfismi sono delle regioni di DNA non codificante ripetute più volte e la lunghezza di questi frammenti varia da individuo ad individuo amplificando la stessa regione di DNA. Questo tipo di analisi attualmente è ampiamente impiegata in campo forense e nelle indagini volte ad identificare sospetti coinvolti in svariati crimini.

