



Scena del Crimine

Determinazione del “profilo del DNA” per stabilire l’identità personale a livello molecolare e identificare l’autore di un reato.

Scuola estate 2021

IIS P. Martinetti

prof.sse Linda Babini & Marzia Andreotti

La scena del crimine e la tipizzazione del DNA.

Quando due persone entrano in contatto, ognuno lascia sull'altro qualcosa di sé; quindi un individuo che commette un crimine lascia qualcosa di sé sul luogo in cui è stato commesso un reato. La scena del crimine è di fondamentale importanza ed è lì che si nascondono i dettagli più significativi per scoprire l'autore del reato.

Il Genetista forense è colui che si occupa delle analisi delle tracce biologiche rinvenute sulla scena del crimine; deve capire che tipologia di traccia si ha davanti (ad esempio se si tratta o meno di sangue) e stabilire le caratteristiche genetiche presenti nella traccia ritrovata, le quali verranno poi confrontate con il DNA dei soggetti sospettati.



Si possono raccogliere referti biologici, come capelli, cellule provenienti dalla pelle o sangue, che possono portare alla scoperta del colpevole. Si analizzano i campioni prelevati e dalle cellule si estrae il DNA, o acido desossiribonucleico. Il DNA, molecola presente nel nucleo cellulare, è unico per ogni individuo, è la sua carta di identità. Il test del DNA gioca un ruolo importante per scoprire il colpevole di un reato.

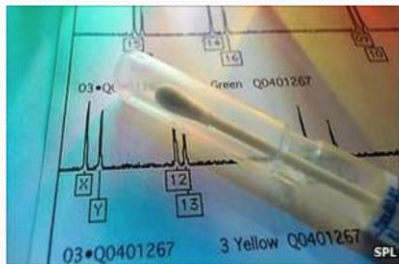
RACCOLTA CAMPIONI E ESTRAZIONE DNA

Le tecniche di fingerprinting DNA sono utilizzate per interpretare il sangue, i tessuti o le prove fluide raccolte in incidenti e scene del crimine. In primo luogo, un campione adatto deve essere trovato. Gli scienziati forensi usano molta cura raccogliendo prove dalle scene del crimine in modo che il DNA non sia danneggiato. Dai campioni biologici prelevati viene **estratto il DNA** e si effettua una centrifugazione per ottenere un concentrato.



Repertazione dei campioni

- Evitare di toccare la zone dove c'è una traccia con mani nude
 - Evitare di tossire o starnutire nelle vicinanze della traccia
 - Ogni traccia deve essere collezionata separatamente
 - Macchie di sangue, di sperma, devono essere essiccate direttamente all'aria prima di essere sigillate
 - Usare buste di carta non di plastica
- —
- Rimuovere la macchia su un cotton fioc inumidito o grattarlo a secco



Conservazione e trasporto dei campioni

Le tracce biologiche si conservano meglio se essiccate e poste in ambiente freddo; condizioni che riducono il tasso di crescita batterica e la degradazione del DNA.

I campioni devono essere sigillati e trasportati con cura

I campioni vanno conservati a +4°C (breve tempo), a - 20°C (lungo tempo) oppure a - 80 °C.

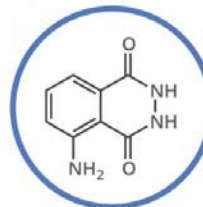
Uso di mezzi chimici per la ricerca di campioni biologici

Luminol per il sangue



CRIME SCENE CHEMISTRY – LUMINOL

WHAT TRIGGERS LUMINOL'S CHEMILUMINESCENCE?



BLOOD



BLEACH



FAECES



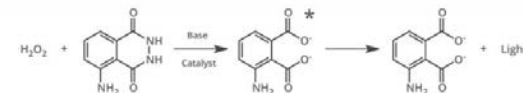
URINE



HORSERADISH

The reaction that triggers luminol's chemiluminescence has to be catalysed. The iron in blood can carry out this role, but luminol can also be oxidised by bleach to achieve the same effect. Enzymes in faeces and horseradish can also help trigger the reaction.

HOW DOES LUMINOL REACT TO PRODUCE LIGHT?



Luminol solution also contains an oxidising agent, such as hydrogen peroxide, and a base. In the presence of a catalyst, the reaction produces energy, promoting electrons in the product to higher energy levels, before they fall back down and release their excess energy as light.

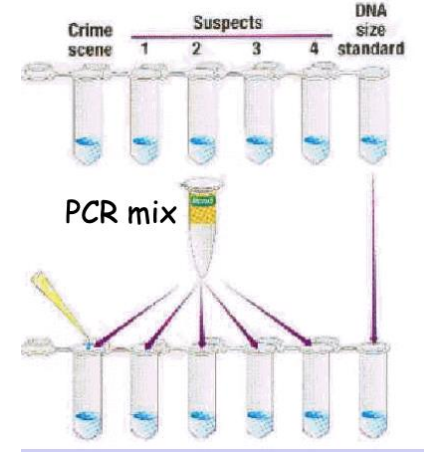


© COMPOUND INTEREST 2016 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
This graphic is shared under a CC BY-NC-ND licence. Luminol photo: Osajus, Flickr.com, CC-BY licence (www.flickr.com/photos/osajus/12424273244/)



Tipizzazione genica - ricerca dei polimorfismi

Il **test di tipizzazione genetica** di un individuo (DNA profiling) si basa sulla possibilità di analizzare regioni del genoma umano e consiste nella evidenziazione di una serie di marcatori genetici che consentono di definire “**l'impronta digitale genetica**” che è unica per ciascun individuo.



Queste parti del genoma, i marcatori, vengono amplificati mediante **PCR** ed analizzati mediante **elettroforesi**.

DNA Fingerprinting

Le piccole differenze di sequenza o "polimorfismi", si verificano in posizioni specifiche in tutto il genoma.

Questi polimorfismi includono cambiamenti di coppie di basi singole e elementi di DNA ripetitivi.

Analizzando diversi i polimorfismi all'interno del genoma di una persona si genera una "impronta" del DNA univoca.

Le **impronte digitali del DNA** ci possono permettere di distinguere un individuo da un altro.



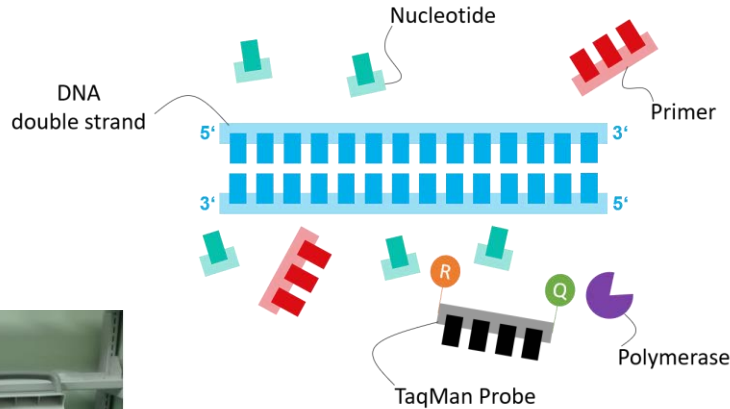
Polymerase chain reaction

Viene poi applicata la tecnica della PCR, utilizzando coppie di primer specifiche. La reazione a catena della polimerasi (in inglese: Polymerase Chain Reaction), comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici.

L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro, molto rapidamente, la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

Il primer riconosce la sequenza di DNA che si vuole amplificare e permette la replicazione solo di queste parti di DNA.

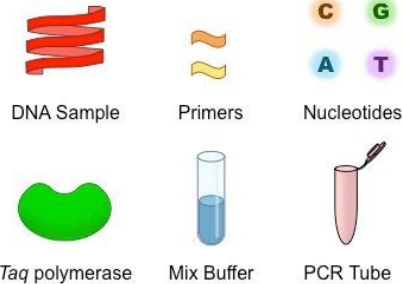
Tale metodica fu ideata da Kary Mullis il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica nel 1993.



PCR

PCR Components

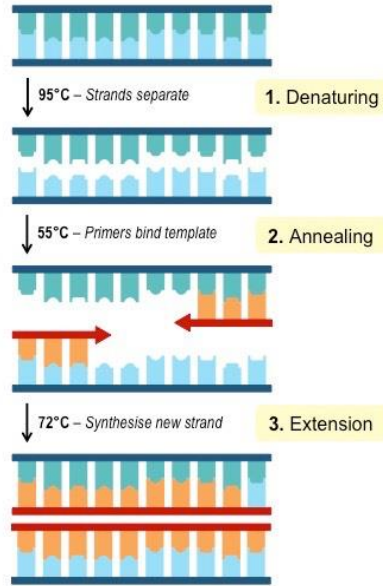
PCR Process (ONE Cycle)



Thermal Cycler



PCR Cycle



Per eseguire la PCR, il DNA purificato a doppio filamento viene miscelato con i **primer** (brevi molecole di **DNA sintetico target** per amplificazione del DNA), una **DNA polimerasi termostabile** (Taq) e **nucleotidi**.

- La miscela viene riscaldata a 95°C per denaturare il duplex del DNA (ad esempio, decompimerlo in singoli filamenti).
- Successivamente, il campione viene quindi raffreddato a 45°C-60°C, permettendo ai primer di accoppiarsi con la sequenza del DNA bersaglio (passaggio chiamato "annealing").
- Infine, la temperatura è elevata a 72°C, la temperatura ottimale a cui la Taq polimerasi estenderà il primer per sintetizzare un nuovo filo di DNA.

Ogni "ciclo PCR" (denaturazione, annealing, estensione) raddoppia la quantità di DNA bersaglio in meno di cinque minuti.

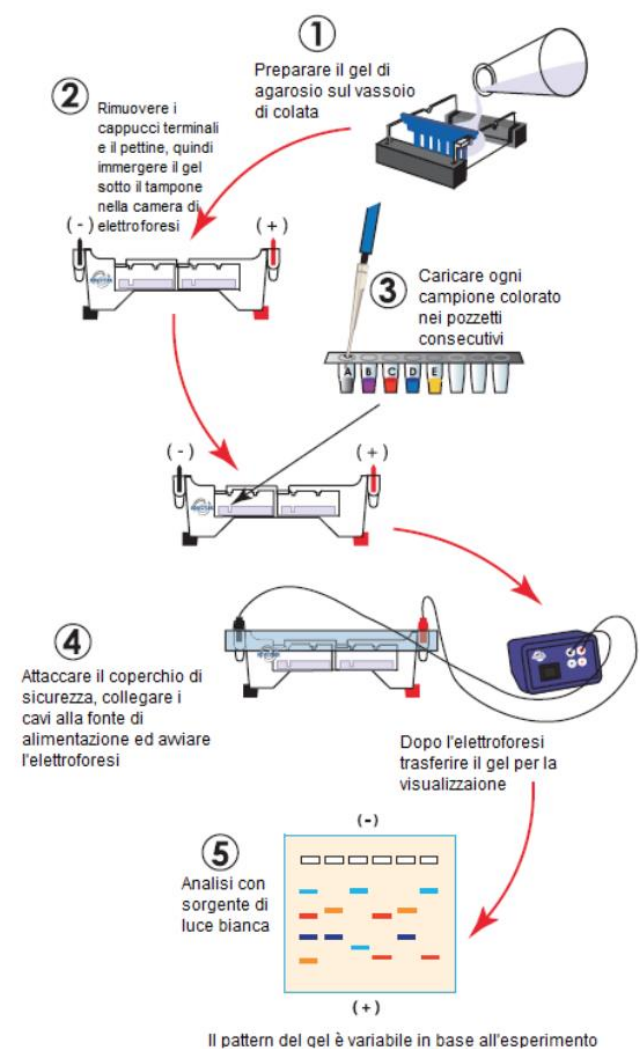
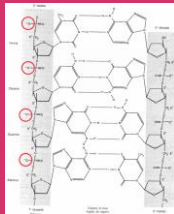
Per produrre abbastanza DNA per l'analisi, possono essere necessari da venti a quaranta cicli.

Per semplificare questo processo, è stata creata una macchina specializzata, chiamata "termociclatore" o "macchina PCR" per riscaldare e raffreddare rapidamente i campioni.

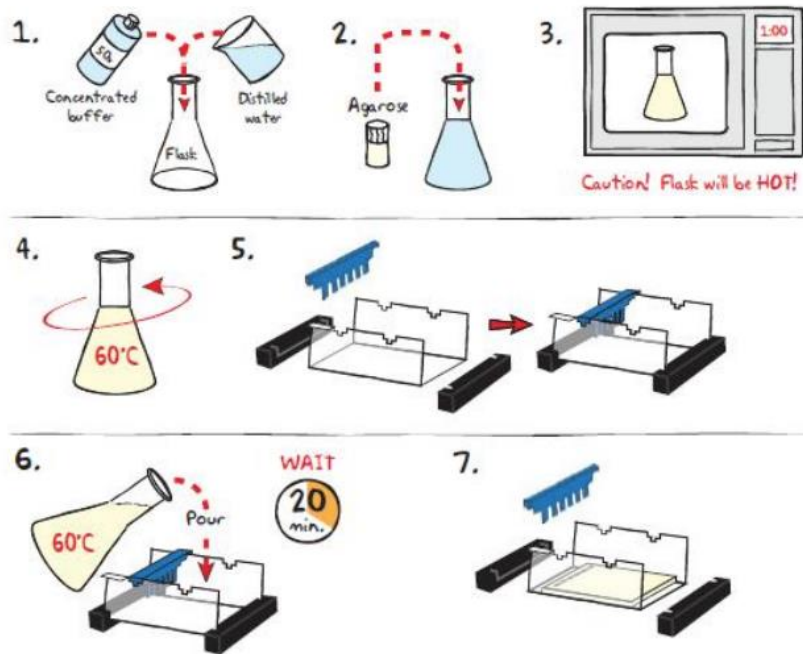
Elettroforesi del DNA

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica utilizzata per analizzare e separare frammenti di acidi nucleici. Questa tecnica sfrutta le cariche presenti nelle molecole di DNA per farle migrare, in un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio. Il gel, costituito da una rete di pori, consente lungo la piastrina di separare le molecole in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi, quindi si avrà una separazione in funzione della velocità.

Essendo il DNA un polianione i frammenti migreranno verso il polo positivo.

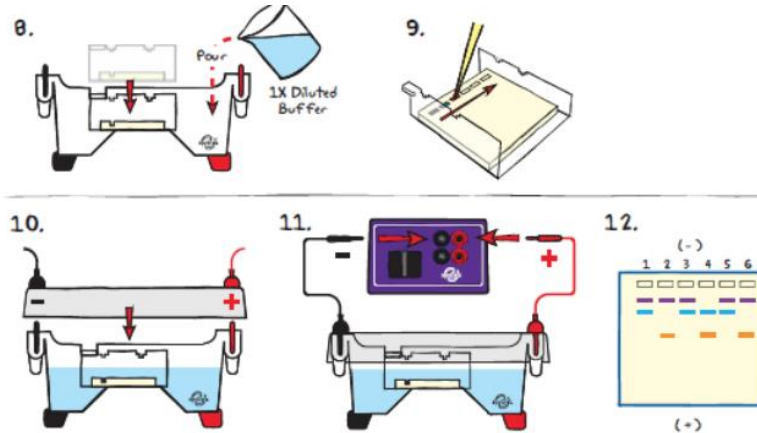


ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO



1. Diluite il tampone concentrato (50X) con acqua distillata per creare un buffer 1X (vedere la Tabella A).
2. Mixare la polvere di agarosio con tampone 1X in una fiasca da 250 ml (vedere la Tabella A).
3. Sciogliere la polvere di agarosio facendo bollire la soluzione. Mettere la soluzione nel microonde per 1 minuto. Rimuovere accuratamente la soluzione dal microonde e farla roteare. Continuare a riscaldare ed agitare la soluzione ogni 15 secondi fino a quando l'agarosio non si è completamente sciolto (la soluzione deve essere limpida come l'acqua).
4. Raffreddare l'agarosio a 60 ° C mescolando per favorire la dissipazione uniforme del calore.
5. Mentre l'agarosio si sta raffreddando, sigillare le estremità del vassoio per il gel con i tappi di gomma. Posizionare il pettine per i pozzetti nell'alloggiamento appropriato.
6. Porre la soluzione di agarosio raffreddata nel vassoio per il gel. Il gel dovrebbe solidificarsi completamente entro 20 minuti. Il gel si irrigidirà e diventerà meno trasparente in quanto si solidifica.
7. Rimuovere i cappucci terminali e il pettine. Prestare particolare attenzione quando si rimuove il pettine per prevenire danni ai pozzetti.

8. Posizionare il gel (sul vassoio) nella camera di elettroforesi. Coprire il gel con tampone per elettroforesi 1X. Il gel dovrebbe essere completamente sommerso.
9. Caricare l'intero campione (35- 38 μL) nel pozzetto in ordine consecutivo.
10. Posizionare il coperchio di sicurezza. Controllare che il gel sia orientato correttamente. Ricorda, i campioni di colorante migreranno verso l'elettrodo positivo (rosso).
11. Connettere alla fonte di alimentazione e avviare l'elettroforesi.
12. Dopo aver completato l'elettroforesi, RIMUOVERE il gel e il vassoio di colata dalla camera di elettroforesi e visualizzare i risultati.



La nostra scena del crimine

- reperto A: macchie di sangue
- reperto B: asta di sostegno
- reperto C: macchia di sangue
- reperto D: capelli
- reperto E: carta sporca di sangue
- reperto F: vetro rotto (beker)

Dai reperti si sono ottenuti:

- le impronte digitali (reperto F-B)
- DNA vittima (reperto A)
- DNA sospettato 1 (reperto D)
- DNA sospettato 2 (reperto B)

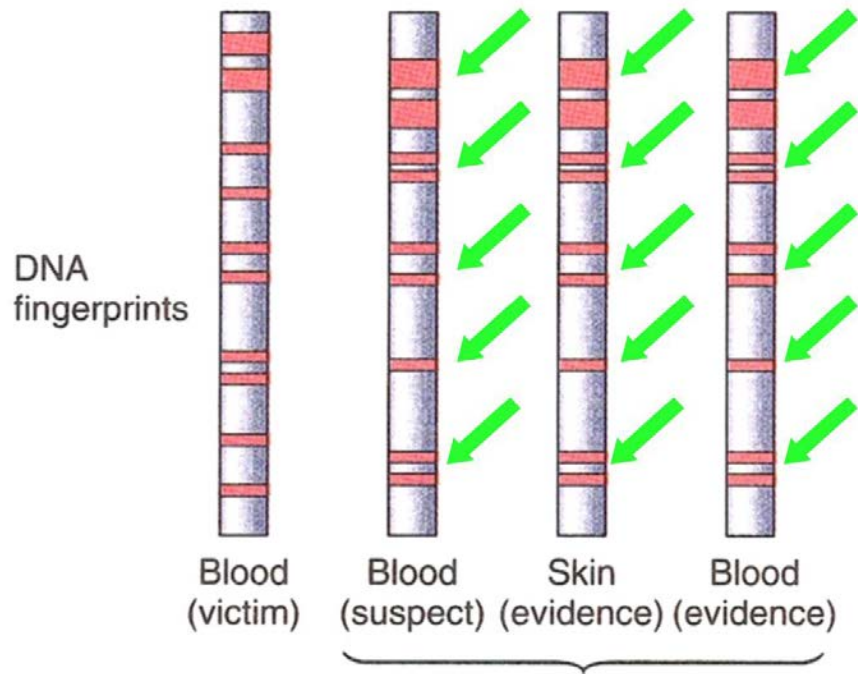
<https://photos.app.goo.gl/J1rH41Hstw3fEdSr9>

Caricamento dei campioni di DNA



I campioni da analizzare vanno depositati, con una micropipetta, in apposite fenditure verticali, dette "pozzetti".

Confronto tra profili genetici



Dopo che il campione della scena del crimine è stato analizzato usando l'elettroforesi, viene confrontato con le impronte digitali del DNA del sospettato o archiviati nel CODIS (COMbined DNA Index System), un database di impronte digitali di DNA di persone condannate criminali, altre scene del crimine e persone scomparse.

Ogni impronta di DNA analizza tredici loci separati, facendo sì che le probabilità di una corrispondenza esatta siano inferiori a una su un trilione.

Questa prova viene quindi utilizzata in tribunale per collegare un sospetto a una scena del crimine

- A. DNA standard, contenente frammenti di lunghezza nota
- B. DNA da confrontare (ipoteticamente raccolto sulla scena del crimine)
- C. DNA del sospetto 1
- D. DNA del sospetto 2
- E. DNA del sospetto 3

