

DALL'ESTRAZIONE DEL DNA AL FINGERPRINTING

INTRODUZIONE

Grazie allo sviluppo scientifico, è attualmente possibile determinare l'impronta genetica di un soggetto partendo da una quantità esigua di materiale biologico a lui appartenente; il test standard, adottato dai laboratori di tutto il mondo, si basa sul prelievo dal cavo orale, mediante un bastoncino idrofilo, di una piccola quantità di saliva nella quale sono presenti un certo numero di cellule della mucosa boccale, sufficienti comunque alla estrazione del DNA necessario alla determinazione dell'impronta genetica del soggetto.

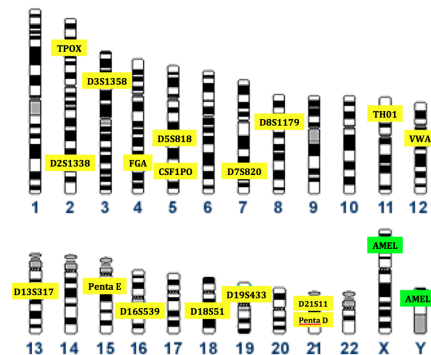
L'FBI ha stabilito una procedura di confronto tra microsatelliti che consente di avere risultati di identificazione personale in cui la probabilità che lo stesso DNA appartenga a due individui contemporaneamente è di uno su un milione di miliardi (1 su 10^{15}); devono essere confrontate 17 sequenze microsatelliti su cromosomi autosomici e 1 sequenza all'interno di un gene presente sui cromosomi sessuali.

Nel nostro esperimento consideriamo i seguenti microsatelliti:

TPOX (ripetizione nell'introne 10 del gene della perossidasi tiroidea umana) sul cromosoma 2, posizione 2p25.3, le cui ripetizioni sono [AATG] da 6 a 14 volte e lo amplifichiamo utilizzando i primer
5'-ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGG-3'
5'-GGAGGAACTGGGAACACACAGGTTA-3'

vWA (ripetizione nell'introne 40 del gene del fattore von Willebrand) sul cromosoma 12, posizione 12p13.31 le cui ripetizioni sono [TCTA] [TCTG] [TCTA] fino a [TCTA] [TCTG]₃[TCTA]₇ e lo amplifichiamo utilizzando i primer
5'-CCCTAGTGGATAAGAATAATC-3'
5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'

D5S818 sul cromosoma 5, posizione 5q23.2, le cui ripetizioni sono [AGAT] da 7 a 15 volte e lo amplifichiamo utilizzando i primer
5'-GGGTGATTTTCCTCTTTGGT-3'
5'-TGATTCCAATCATAGCCACA-3'



ESTRAZIONE DI DNA DA CELLULE DI SFALDAMENTO DELLA MUCOSA BOCCALE

- Riportare in una *eppendorf* da 1,5 ml il codice identificativo di ciascun studente e aggiungere 400 µl di tampone di estrazione (Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 10mM pH8; NaCl 10mM; Triton 0,5%) già addizionata con 1 µl di proteinasi K
- Strofinare sulle gengive una paletta sterile e su entrambe le guance della cavità orale (la quantità di cellule che si ottiene è importante per una buona riuscita del test).

Mettere la spatola all'interno della provetta da 1,5 ml contenente la soluzione A, strisciandola lungo il bordo e ruotandola in senso orario e antiorario

- Incubare a 50 °C in un termostato per 5 minuti (attiva la proteinasi K e inattiva le nucleasi)
- Centrifugare per 10 minuti a 13000 rpm, per far depositare i detriti cellulari
- Trasferire 200 µl di surnatante in una nuova *eppendorf* facendo attenzione a non prelevare il pellet (formatosi sul fondo)
- Aggiungere 20 µl di soluzione di cloruro di sodio (NaCl) al 5% e 200 µl di isopropanolo.
- Miscelare invertendo le *eppendorf* (5x)
- Centrifugare per 5 minuti a 13000 rpm
- Eliminare il surnatante facendo attenzione a non perdere il pellet
- Lavare il pellet addizionando 200 µl di etanolo al 70%
- Centrifugare per 5 minuti ed eliminare il surnatante
- Lasciare asciugare il pellet in stufa a 60° C per 10 minuti lasciando la provetta aperta
- Quando il pellet è completamente secco, risospenderlo con 50 µl di TE con RNasi e incubare a 37°C per 10 min.
- Per la PCR: a 10 µl di Mix di PCR aggiungere 2 µl di DNA genomico precedentemente estratto.
- Ogni provetta *eppendorf* da PCR è contrassegnata da: V= Vittima (uno studente userà questa provetta per il suo DNA); 2= Scena del crimine (questa provetta viene utilizzata dal tutor per inserire 2 µl di DNA estratto da uno studente a caso; il gruppo non sa quale è lo studente scelto); 3, 4, 5.... provette per il DNA dei vari studenti del gruppo

Schema della PCR

La reazione di amplificazione viene effettuata in un volume finale di 12 µl così suddiviso (i volumi riportati si riferiscono ad un singolo campione):

| Quantità | Reagenti |
|----------------|---|
| 2 µl | DNA genomico (circa 10-50 ng) |
| 0.5 µl +0.5 µl | 3 coppie di <i>primer</i> (<i>forward</i> e <i>reverse</i>), concentrazione di 15 pmoli/µl (15mM) |
| 0.5 µl | dNTP (10mM) |
| 1.2 µl | 10X Taq Buffer con MgCl ₂ |
| 0.2 µl | Taq DNA Polymerase (5U/ µl) |
| 7.1 µl | Acqua sterile |

Totale 12 μ l

IMPORTANTE: ricordarsi di sostituire i puntali ogni volta che si prelevano i diversi reagenti e ogni volta che si aliquota la mix nelle singole *eppendorf* !

Lo schema generale del programma di PCR utilizzato è il seguente:

94 °C 2 min

94 °C 30 sec 58 °C 30 sec 72 °C 1 min x 30 cicli

72 °C 5 min

4 °C fino all'analisi

Una volta finita l'amplificazione, dopo circa 1,5 ora, i campioni verranno caricati nel gel di agarosio al 2% per la corsa elettroforetica.

Corsa elettroforetica su gel di agarosio

Aggiungere 2 μ l di campione al loading dye 6X.

Centrifugare brevemente in una microcentrifuga eppendorf (in gergo di laboratorio, si dice spinnare da spin, centrifugare)

- Nel primo pozzetto a sinistra, caricare 8-10 μ l di marcatore di peso molecolare e poi i campioni nei pozzetti successivi, ponendosi con la punta della micropipetta perpendicolari rispetto al gel e in un angolo del pozzetto, facendo attenzione a non bucare in fondo del pozzetto e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
- Chiudere il coperchio della cella elettroforetica
- Collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli del generatore di corrente, detto anche power supply; e fissare il voltaggio iniziale al valore di 80V: dopo che il DNA è uscito dai pozzetti, il voltaggio va alzato a 100V; lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 40 minuti