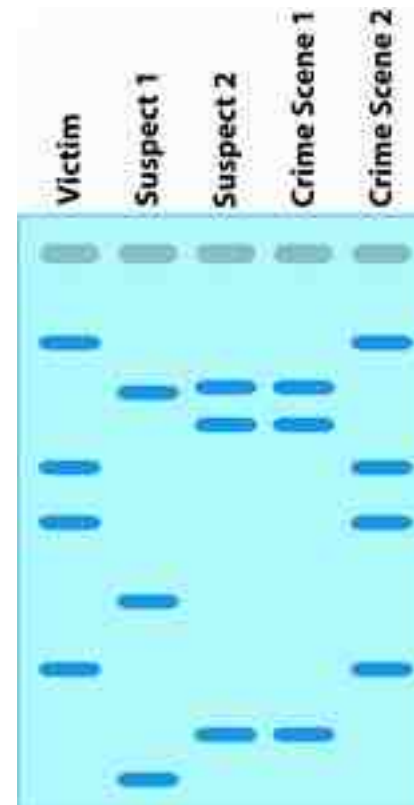
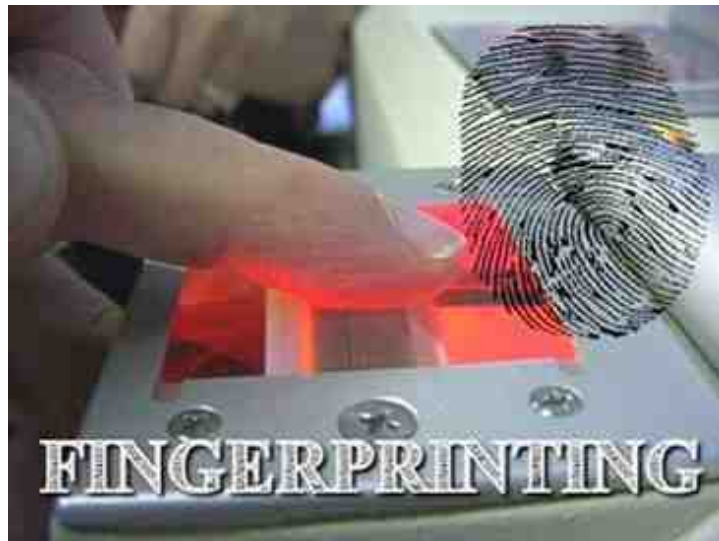


DNA fingerprinting-

in collaborazione con LLC - Bologna

$$e$$

Ecole de l'ADN - Nîmes



Science centre Aosta

DNA fingerprinting

- Il DNA fingerprinting è un **protocollo sperimentale** che permette
- di **distinguere**,
e a volte **riconoscere** ,
individui diversi, in quanto le loro molecole di DNA sono diverse
- Queste differenze vengono utilizzate per studi in diversi ambiti:
- nelle indagini della polizia scientifica,
- in medicina, nello studio dell' evoluzione

L'inventore

- Il metodo del DNA fingerprinting fu inventato nel 1985 da Alec Jeffreys dell'Università di Leicester.



Protocollo del DNA fingerprinting

FASI:

- Estrazione del DNA (da plasmidi batterici) - già fatta
- 1. Sezionamento del **plasmide** in segmenti (di diversa lunghezza) mediante enzimi di restrizione (forbici molecolari)
- 2. La separazione dei frammenti mediante **Elettroforesi (setaccio molecolare)**
- 3. Colorazione per l'osservazione ed il riconoscimento mediante **transilluminatore**

DNA fingerprinting

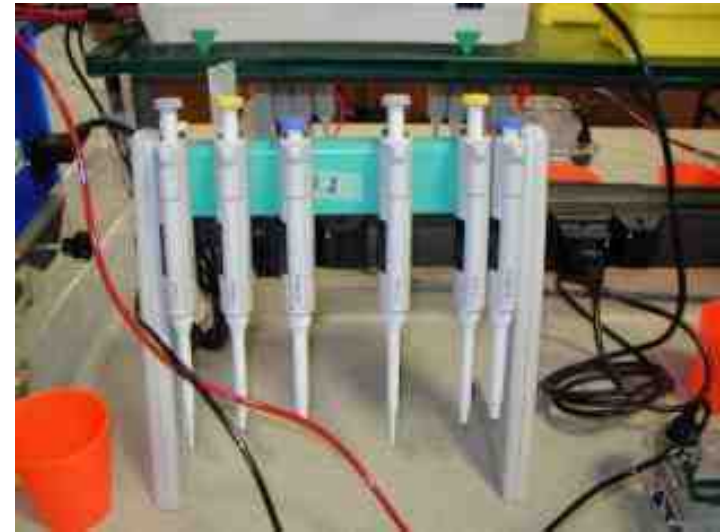


Nell'esperienza riprodurremo una indagine della polizia scientifica:

- Il materiale biologico: sangue, capelli ecc, ritrovati sul luogo del delitto (C = colpevole)
- viene analizzato
- e confrontato con quello di alcuni sospettati (campioni 1,2,3,)
- tra i quali va individuato il colpevole.

Materiale 1

- Micropipette + punte
- 2-20 μ l grigio - punte bianche piccole
- 10 - 100 μ l grigio - punte bianche grande
- 20 - 100 μ l grigio - punte gialle
- 100 - 1000 μ l gialle - punte azzurre
- Portapunte
- Bicchiere per spazzatura



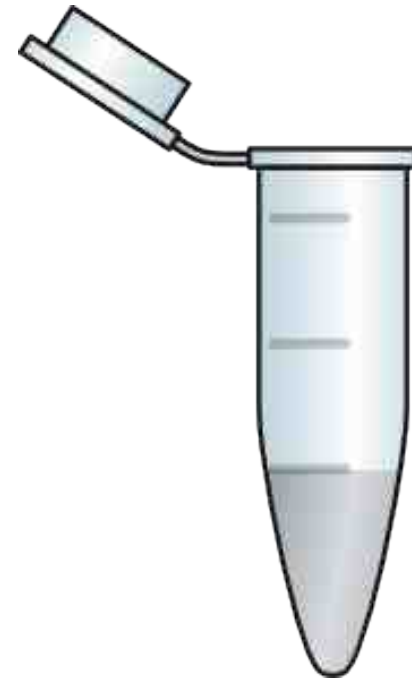
Materiale 2

"spugnetta" per ogni studente, con numero

- 4 Eppendorf- piccole provette con tappo vuote indicate con 1,2,3,C

"spugnetta comune"

- 4 Eppendorf piene con 1,2,3,C
- Eppendorf con Colorante per esercitazione
- Eppendorf con enzima di restrizione Pst1
verde piccolo o pallino sul tappo
- Eppendorf con soluzione tampone
verde grande o T
- Eppendorf con Loading dye arancione



Impariamo ad utilizzare le micropipette

Caricare 17 μ l con acqua colorata con Blu di metilene- Eppendorf blu

1. Scegliere la micropipetta corretta
2. Ruotare la vite
3. Inserire il puntale
4. Verificare i due livelli della pompa
5. Premere fino a metà la pompa - 1° livello
6. Immergere nell'Eppendorf
7. Rilasciare la pompa
8. Premere la pompa , fino al fondo - 2 livello
(rimettendo il Blu di metilene nell'Eppendorf)
- 9 Buttare la punta nel bicchiere premendo il pistone laterale



Protocollo sperimentale

Caricare ciascuna delle 4 provette Eppendorf vuote, segnate con 1,2,3 C con

- 2 μ l di soluzione tampone preso dall'Eppendorf indicato con T / tampone (buffer)
- Usando lo stesso puntale
- 2,5 μ l di enzima prendendolo dall'Eppendorf indicato con Enzima / pallino blu
- Usando lo stesso puntale

Quindi ogni Eppendorf 1,2,3,C con

- 16 μ l di DNA di ogni campione nella corrispondente provetta 1--> 1, 2-->2 ecc
- Cambiando ogni volta il puntale

s.o.science centre



Mettere quindi le quattro provette

- nella centrifuga , bilanciandole nei 6 fori
- per 10 secondi

Poi in cella termostatica - "bagnomaria "

- con la propria spugnetta, controllando il proprio numero
- a 37°C per 20 minuti.

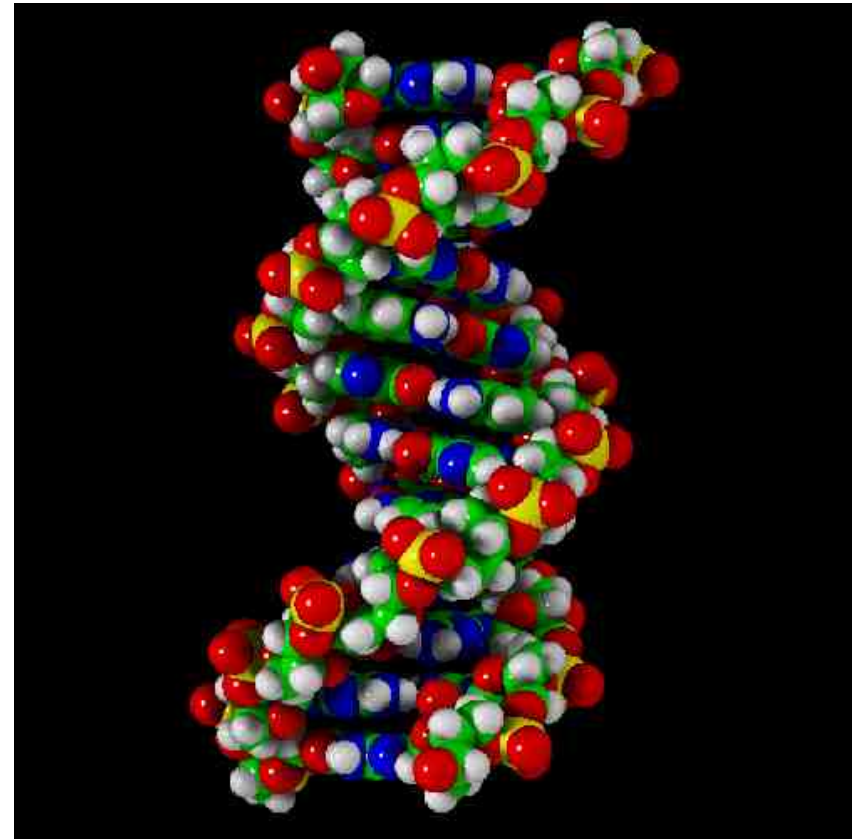
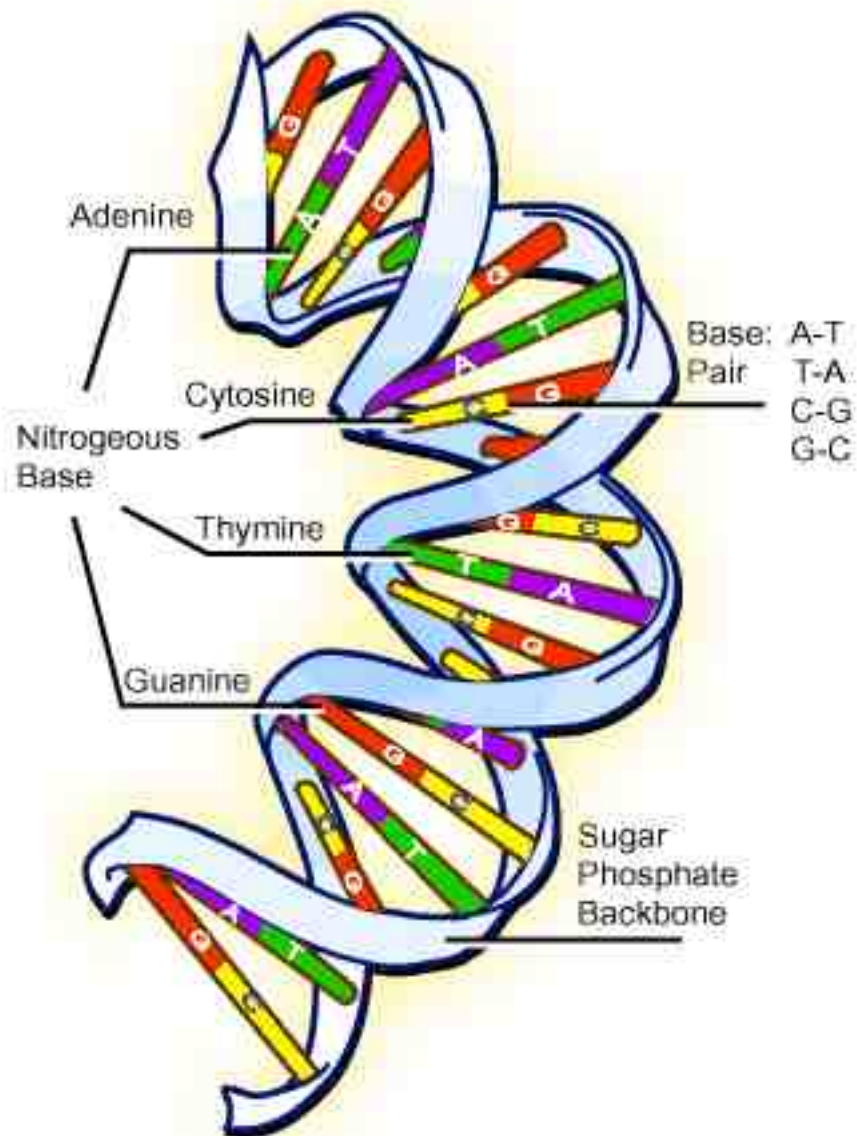


Con questo metodo è possibile

- identificare un individuo analizzandone il DNA
- fare un "profilo del DNA"



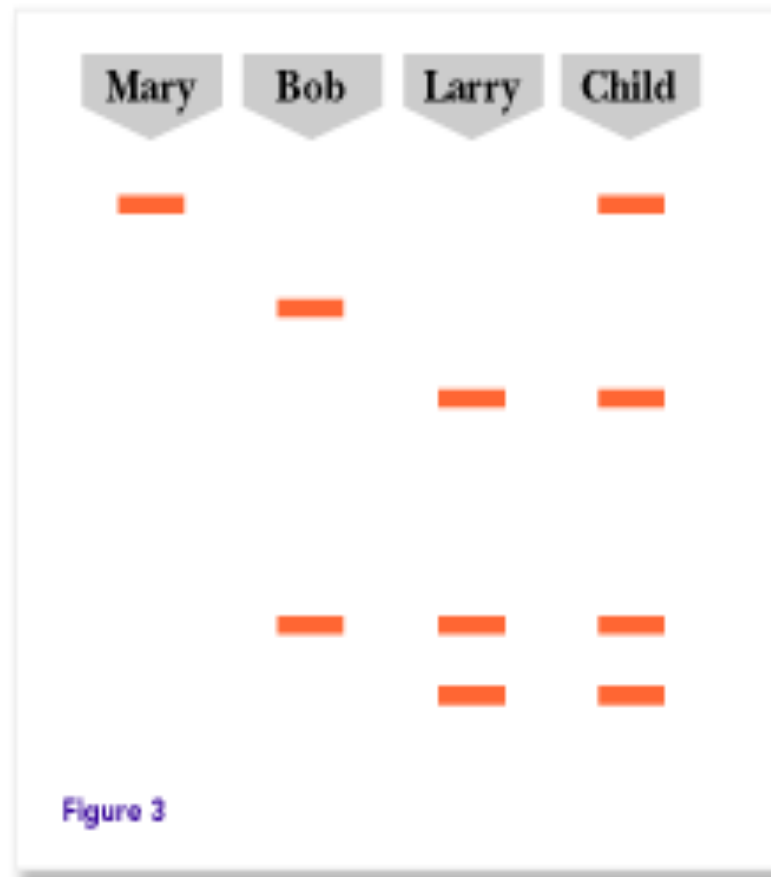
il DNA



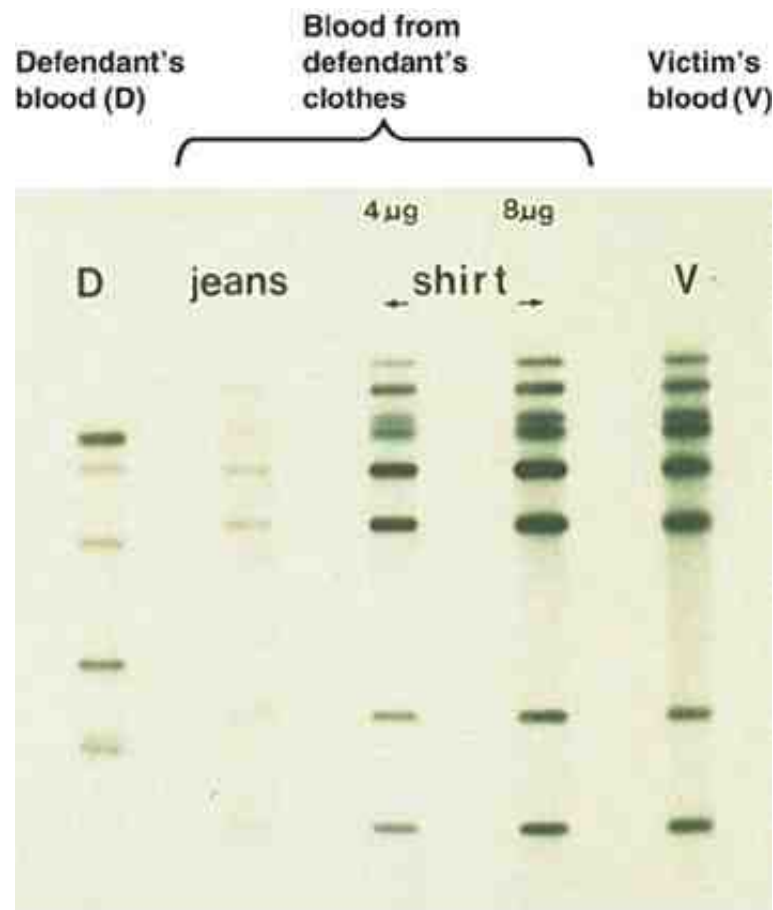
- In ciascun individuo il profilo del DNA è specifico
- La possibilità che due persone abbiano esattamente lo stesso profilo del DNA è di 1 a 30.000 milioni (con l'eccezione dei gemelli omozigoti).
- questa caratteristica viene utilizzata dalla scienza forense, che è l'uso in ambito legale delle conoscenze scientifiche



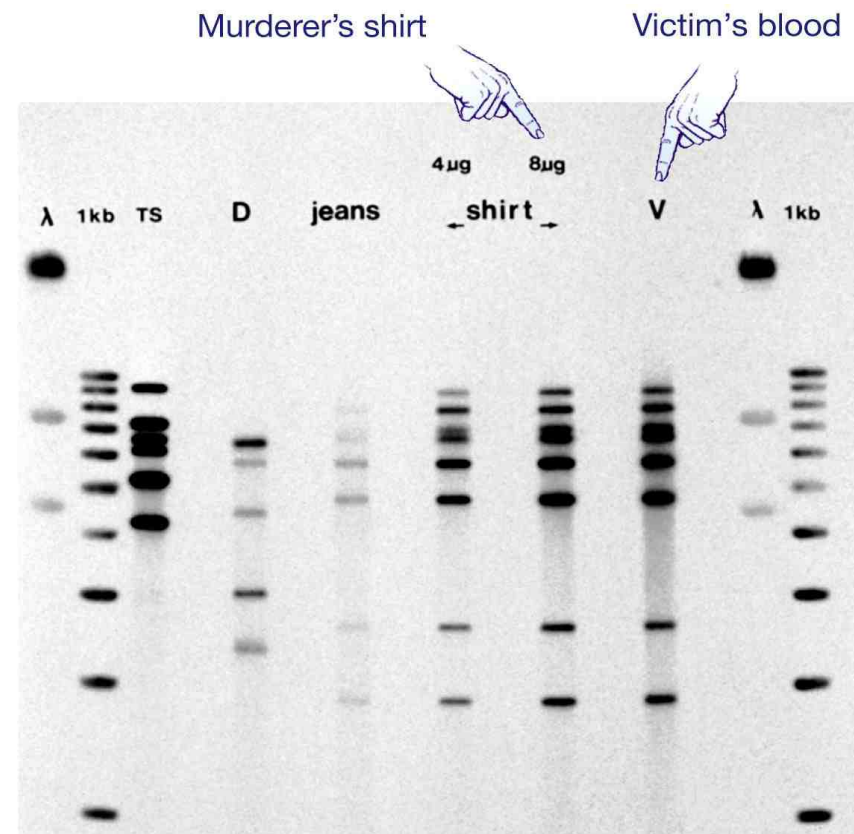
DNA Fingerprinting può essere usato nei test di paternità



per individuare i colpevoli - e gli innocenti



s.o.science centre

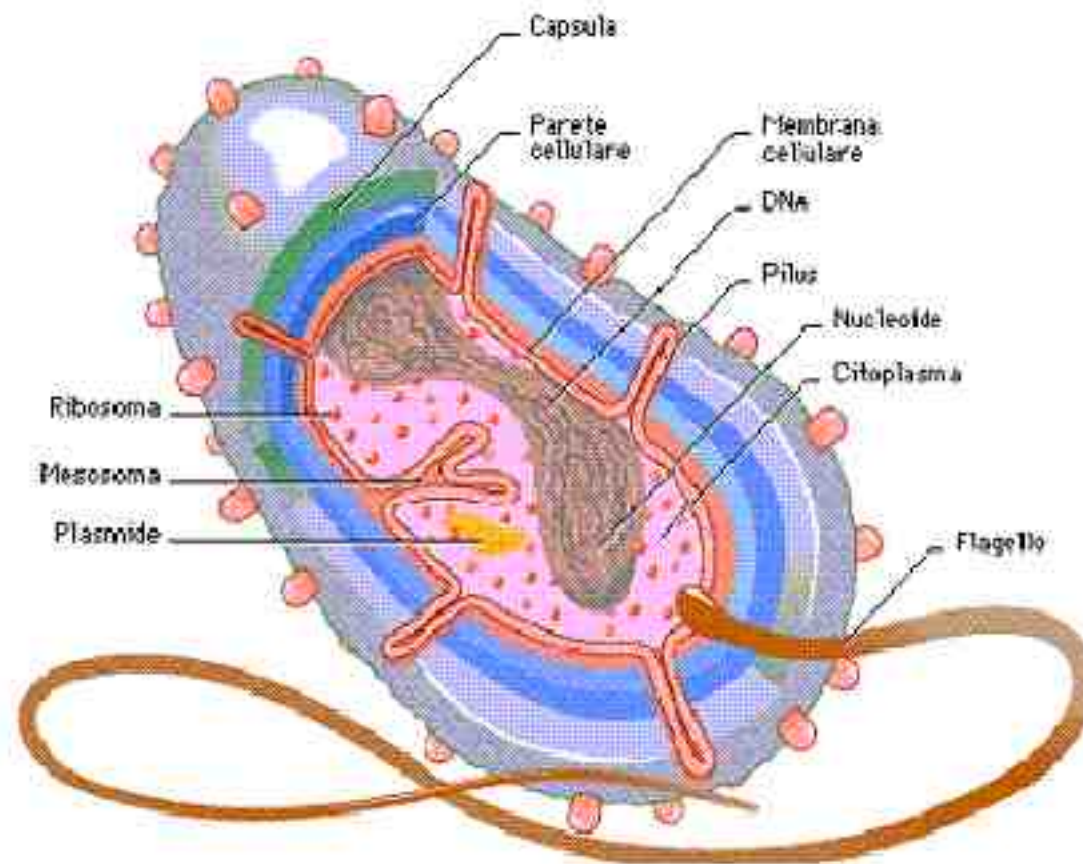


Copyright © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

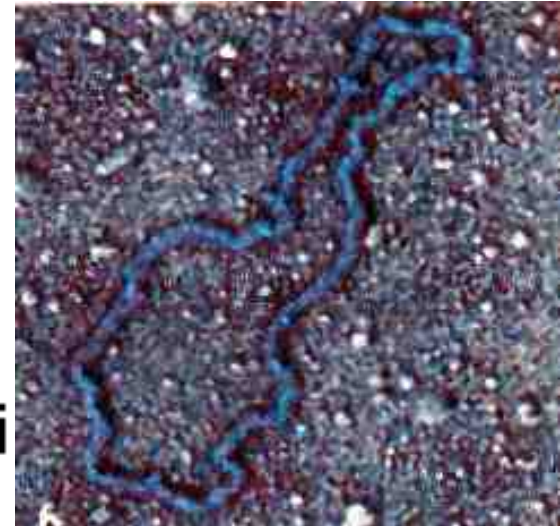
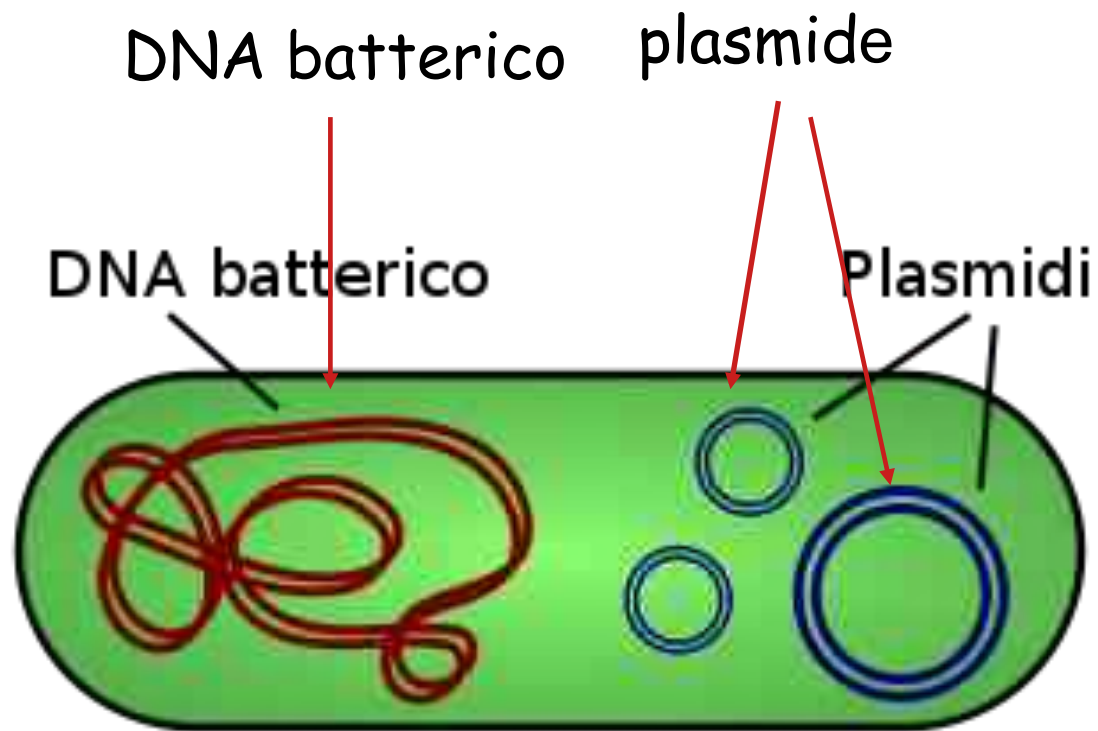
- Si verifica un omicidio.
Viene trovato del sangue sulla scena del crimine
Con il fingerprinting si preparano profili del DNA, della vittima,
delle tracce trovate e del sospetto.
- Il sospetto era sulla scena del crimine ?

Profilo del sospetto	Campione di sangue dalla scena del crimine	Profilo della vittima
_____	_____	_____
=====	=====	_____
_____	_____	=====
=====	=====	_____
_____	_____	_____

Cellula batterica



Plasmide



Il plasmide è una piccola molecola circolare di DNA circa 1.000 volte più piccolo del cromosoma.

Le forbici molecolari

- Dopo l'estrazione, il DNA viene sezionato
- utilizzando degli Enzimi di restrizione,
- detti "forbici molecolari" perché tagliano il DNA in punti specifici

Ogni enzima di restrizione taglia in corrispondenza di una precisa sequenza del DNA

In organismi diversi producono tagli di lunghezza e peso diversi



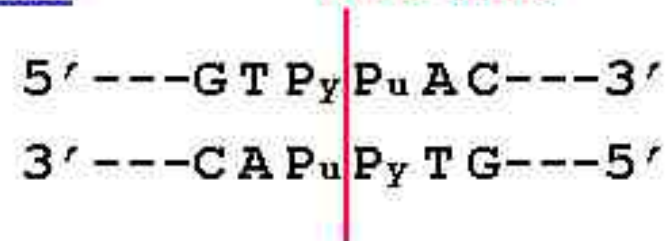
EcoRI

sito di taglio



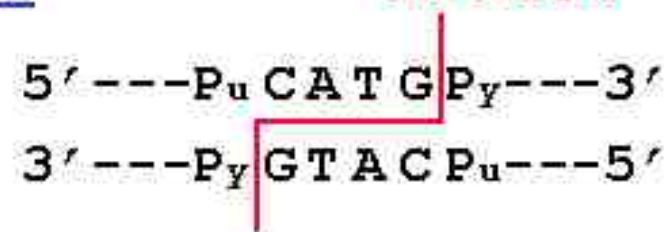
HincII

sito di taglio

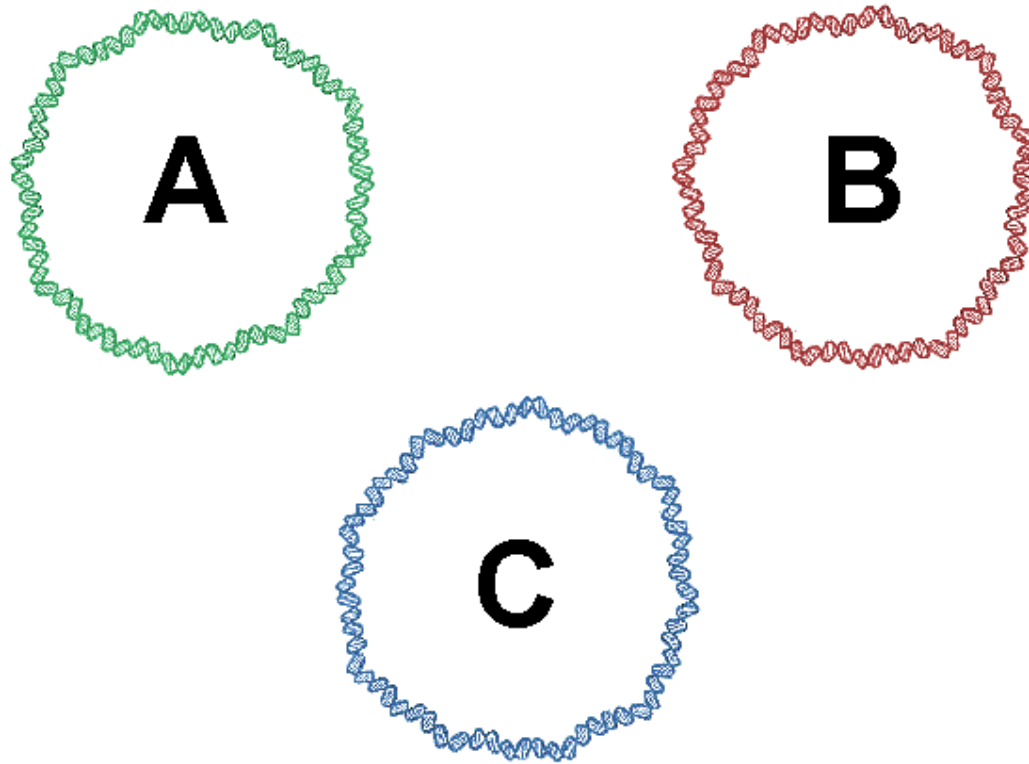


NspI

sito di taglio

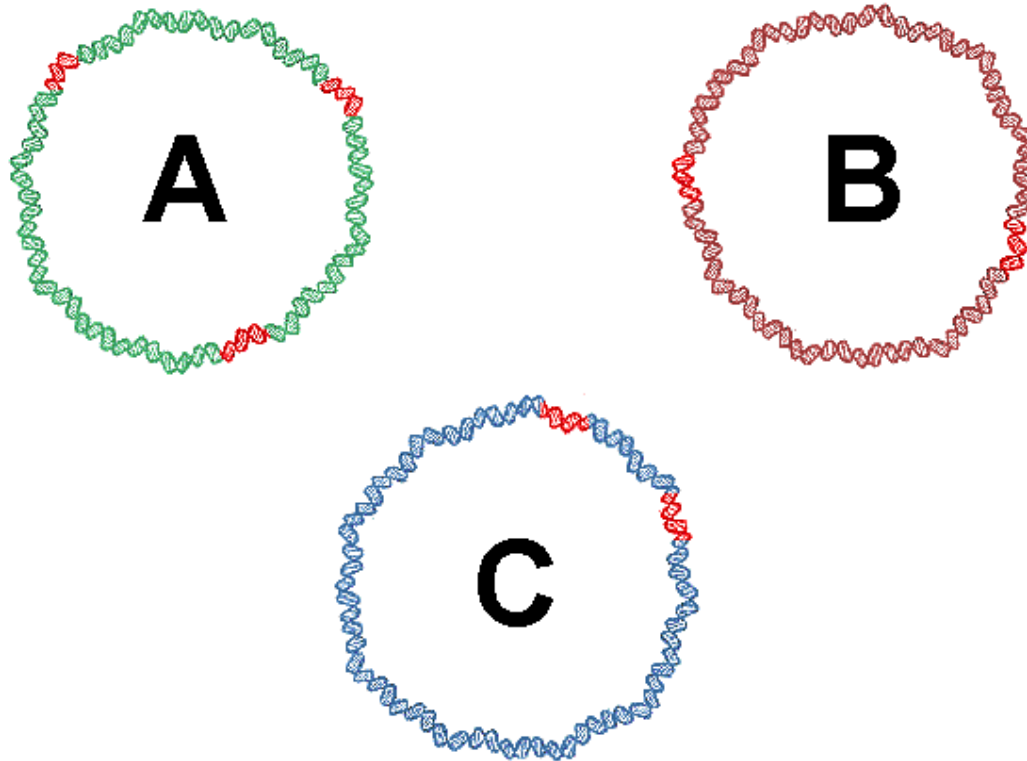


Tre plasmidi



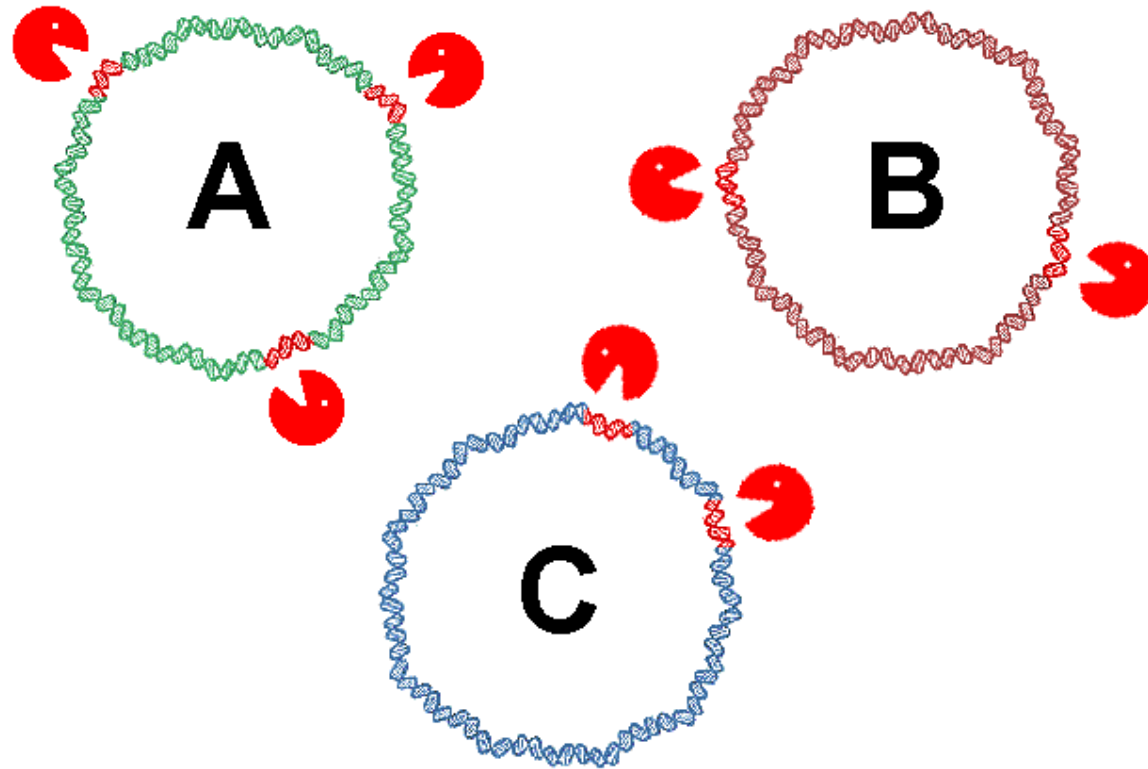
s.o.science centre con diversa sequenza di DNA.

in rosso

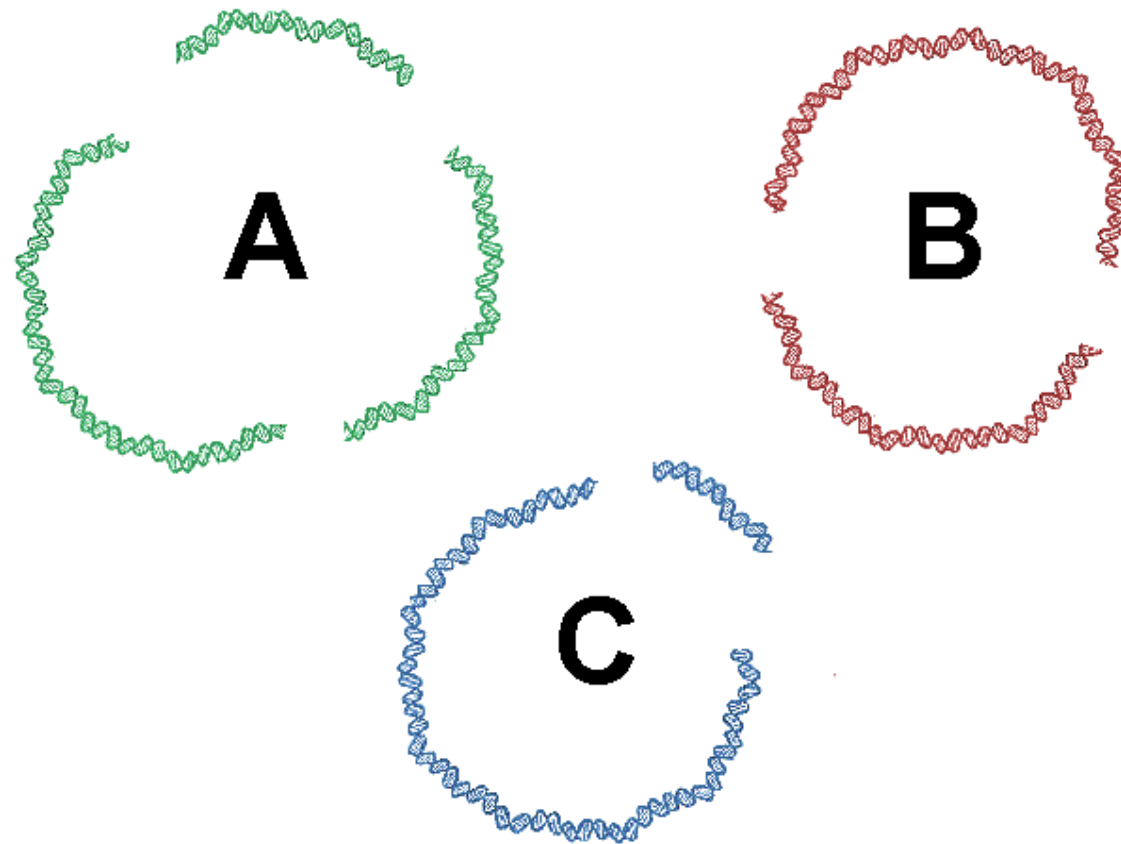


sono evidenziate le sequenze del DNA in cui agiranno le
"forbici molecolari" = enzimi di restrizione

Questi siti



...vengono riconosciuti dagli enzimi di restrizione...



A

B

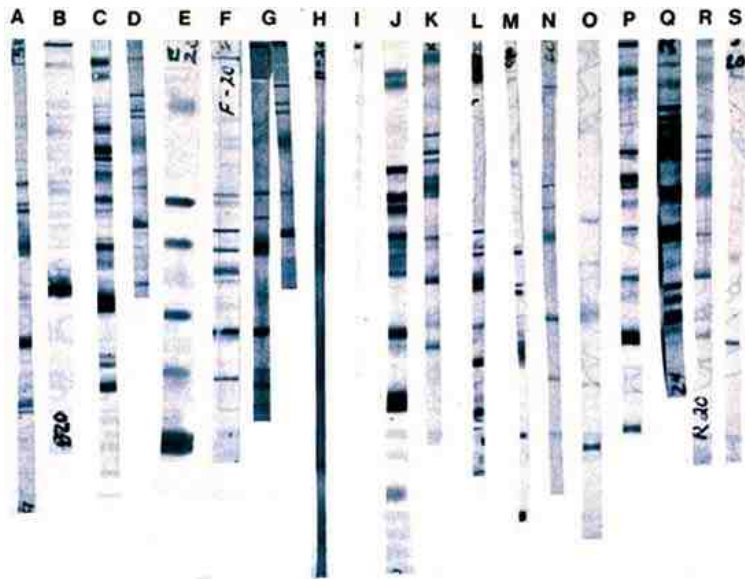
C



in frammenti di diversa lunghezza e di diverso peso...

Processo detto di "Digestione"

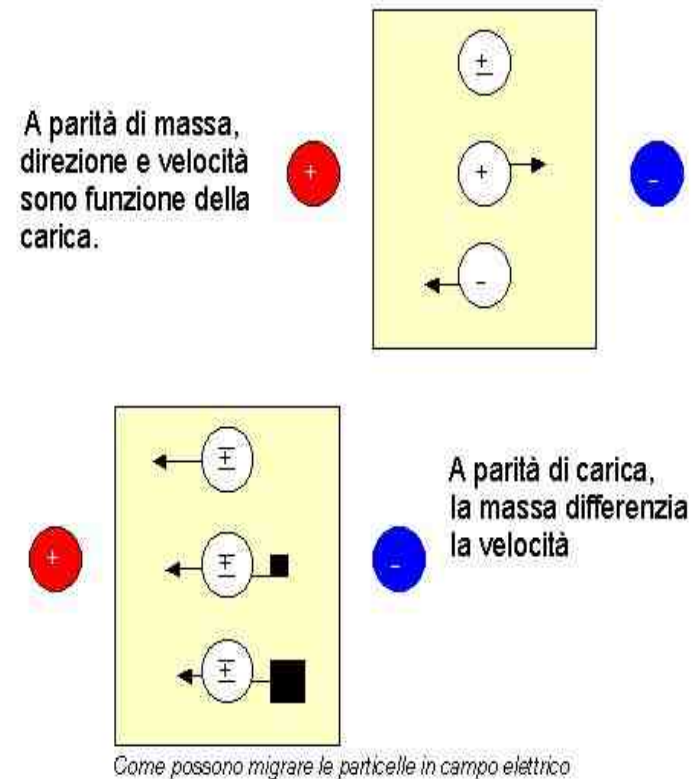
- che possono essere evidenziati mediante la tecnica della "Elettroforesi su gel"
- che separa i frammenti di DNA in base alla loro dimensione:



L'elettroforesi su gel

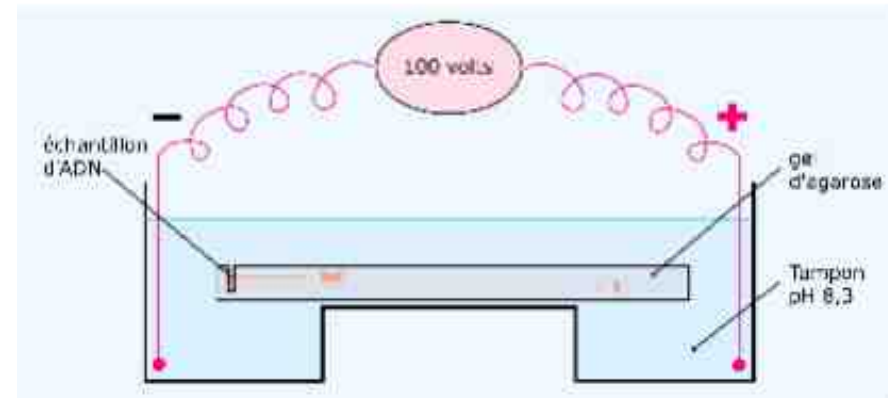
- In una cella elettroforetica
- su una base opportuna in cui passa corrente
- il DNA carico negativamente migrerà verso il polo positivo.
- frammenti più corti "corrono" più velocemente
- frammenti più lunghi, più lentamente

Quindi si separano



Apparato elettroforetico

- Scatola , "cella" con elettrodi
- in cui scorre corrente elettrica
- Contenente Gel di agarosio
- con otto pozzetti



Il gel di agarosio

- L'agarosio è uno zucchero che si ottiene dalla stessa alga da cui si ottiene l'agar e che forma una trama entro cui si muovono i frammenti di DNA: "setaggio molecolare"

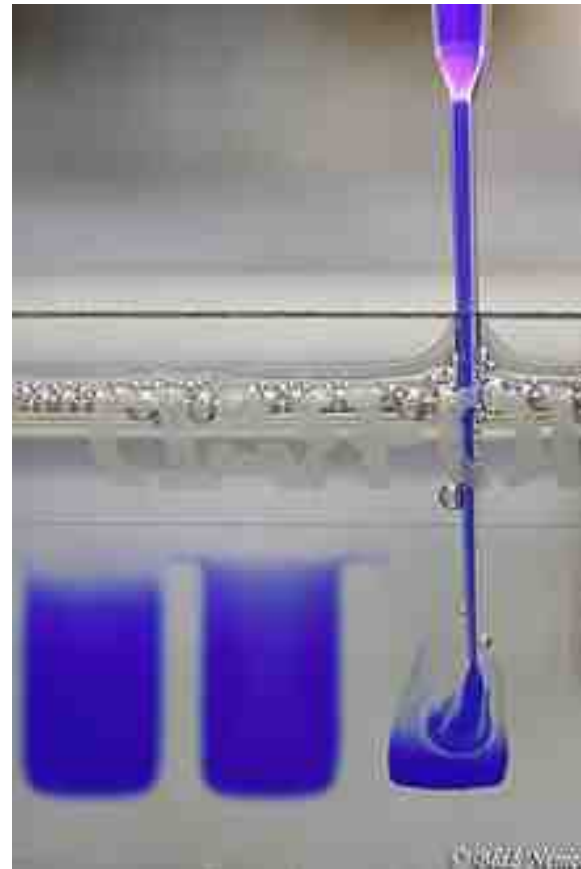
Si ottiene con

- una soluzione di [agarosio](#) allo 1 % (cioè 1 grammo ogni 100 ml di soluzione)
- una soluzione di TBE 10 % (cioè 1 g ogni 10 ml di soluzione)
- Il TBE è un "tampone" cioè è una soluzione che conduce l'elettricità nell'elettroforesi e mantiene costante il pH.



Impariamo a "caricare i pozzetti"

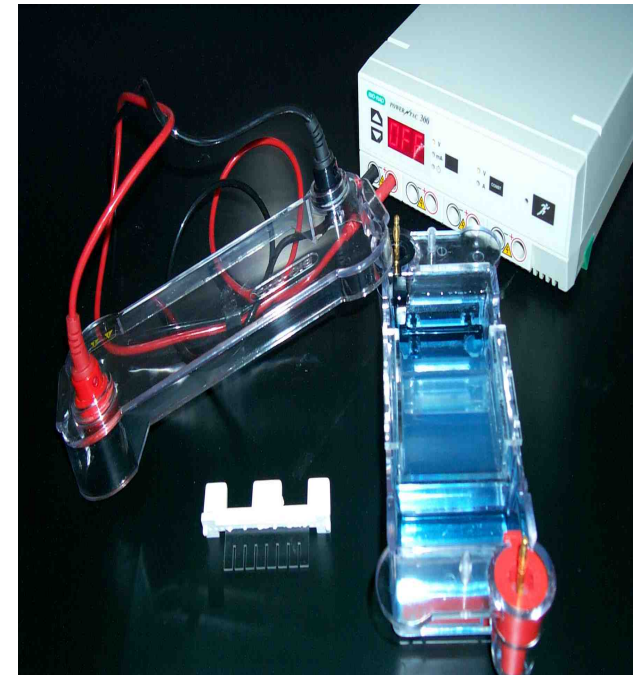
- Aspiriamo con la micropipetta 18 μ l
- di Blu di metilene
- e con mano ferma
- lo rilasciamo nel piccolo foro nel gel di agarosio



Colorazione

Aggiungere 2 μ l di Loading dye
Eppendorf arancione

- ad ogni Eppendorf 1,2,3,C
- Attenzione a non immergere il
puntale!
- Agitare ogni Eppendorf per
mescolare

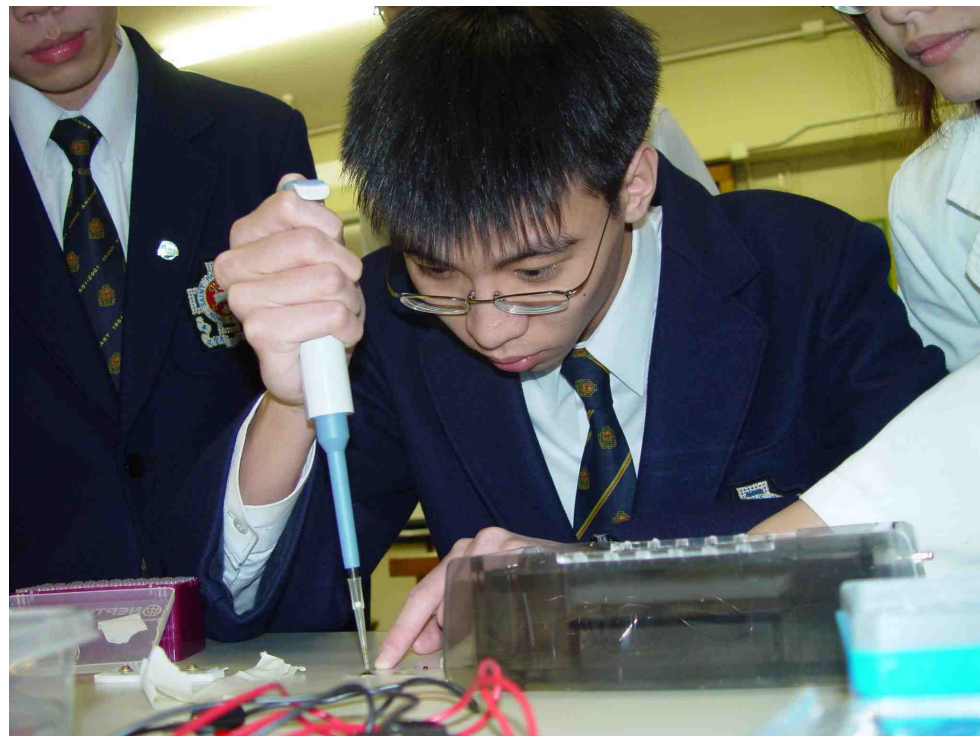


Quindi iniziare il caricamento
dei pozzetti,

- 2 studenti per ogni cella
elettroforetica

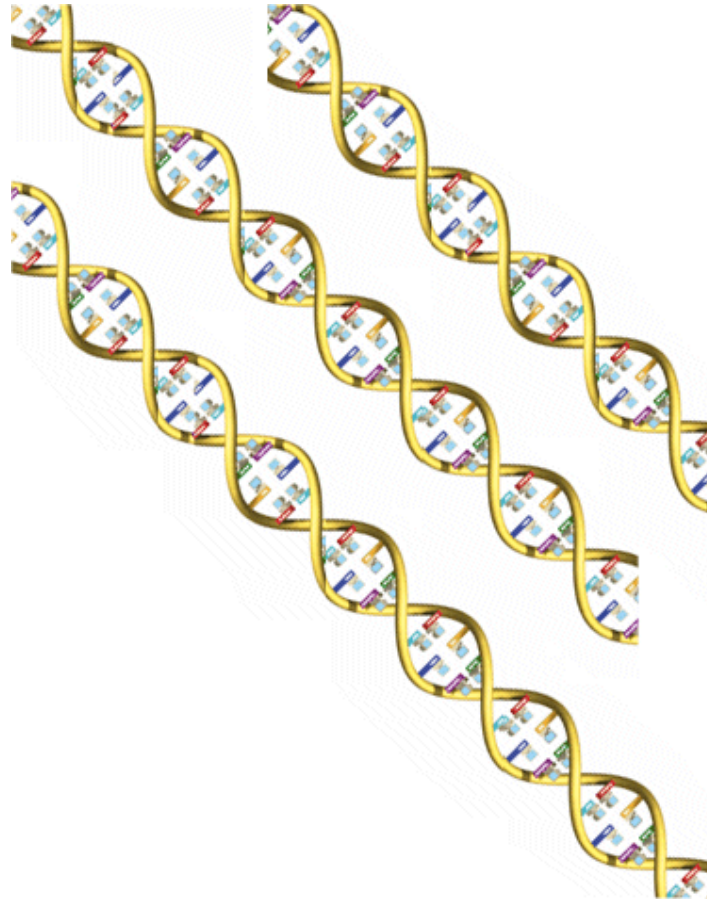
Caricando gli 8 pozzetti

- 1,2,3,C
- 1,2,3,C

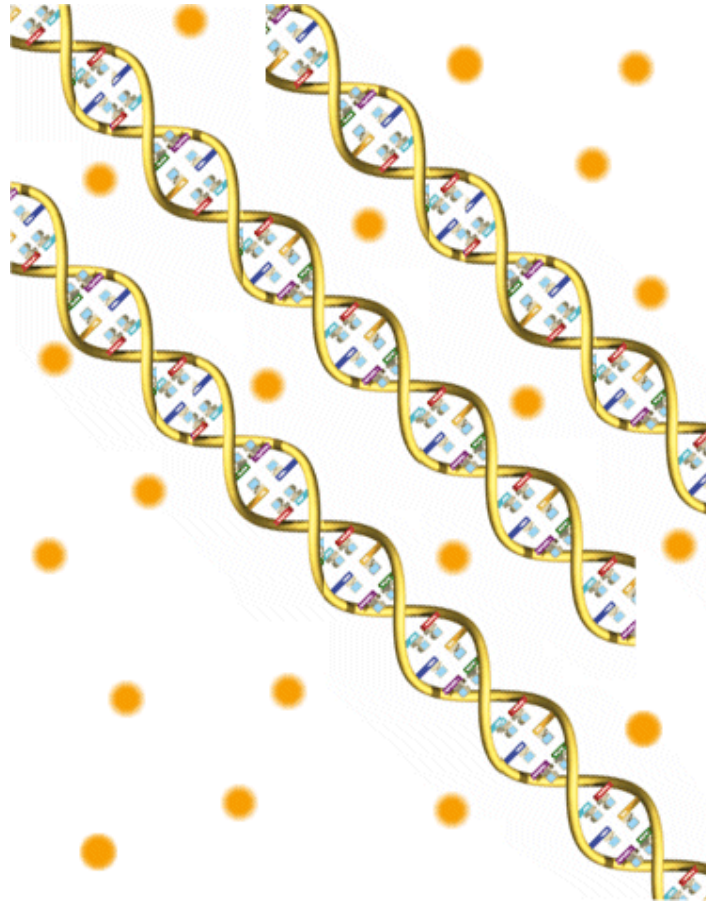


s.o.science centre

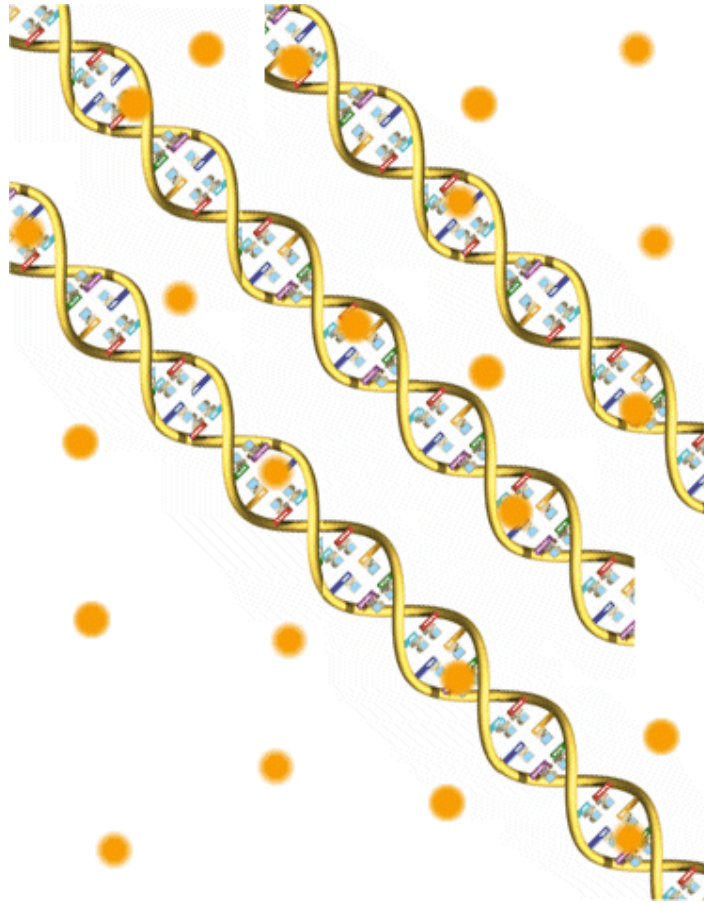
Colorazione



Per rendere visibili i frammenti...

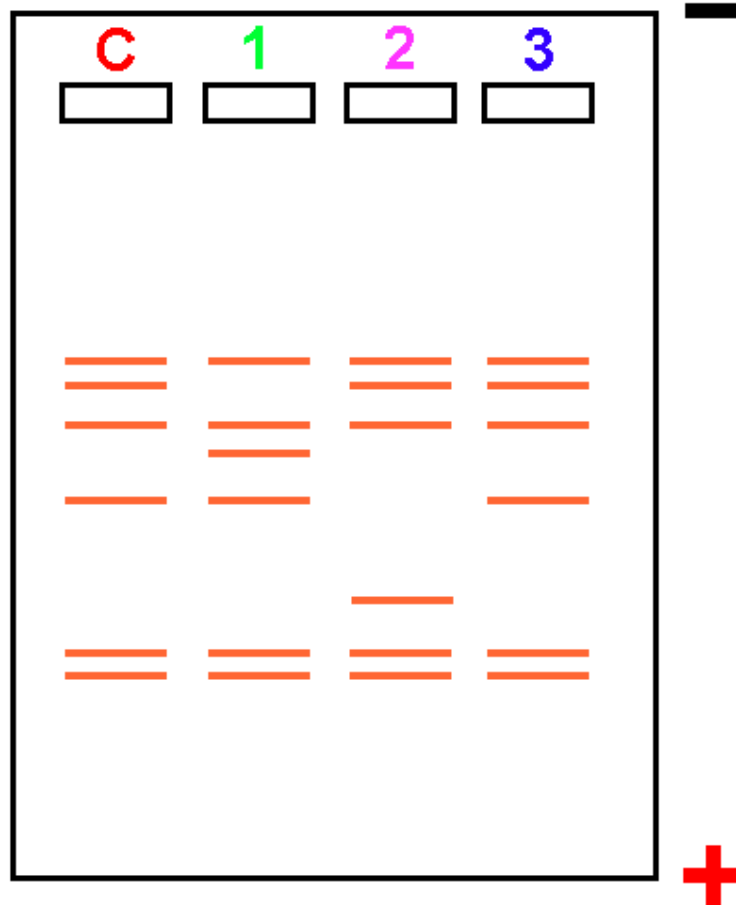


• si aggiunge un colorante che interagisce con il DNA...



s.o.science centre ora i frammenti sono visibili come bande arancioni

Colorazione



Al termine dell'elettroforesi



Colorazione del gel con Azure A

- 1 ml di Azure A in 100 ml di etanolo a 20°
- Dopo la migrazione, immergere il gel di agarosio nella soluzione per 6 minuti
- Immergere una volta in etanolo a 70°
- Poi in acqua corrente
- Quindi osservare con il transilluminatore





s.o.science centre



s.o.science centre