

REPÀS DE PCR: STR (INDIVIDUAL-GRUPAL)

Aquesta activitat pretén ser un repàs d'alguns conceptes vistos en el PJ4 mitjançant la interpretació de resultats de criminalística i proves de paternitat. Per tant, també s'està aprofundint en alguns aspectes de Biologia Molecular.

Veureu que hi ha **una part individual i una part grupal**.

Un cop feta l'activitat us penjarem solucionari a la Fase 4. D'aquesta activitat no cal presentar autocorrecció però si que val la pena que compareu les vostres respostes amb el solucionari.

PART INDIVIDUAL

Què són els STR?

Actualment s'estan utilitzant tècniques molt segures per identificar persones, a partir de l'anàlisi de l'ADN, que permeten inculpar persones en **investigació criminal**, o **afirmar la paternitat**.

Un microsatèl·lit és una seqüència de ADN en la que es repeteixen certs àcids nucleics (entre 1 i 6 parells de bases), generalment entre 5 i 50 vegades. Normalment es troben en regions no codificants de l'ADN. Aquests microsatèl·lits també es coneixen com a **STR (Short Tandem Repeats)**.

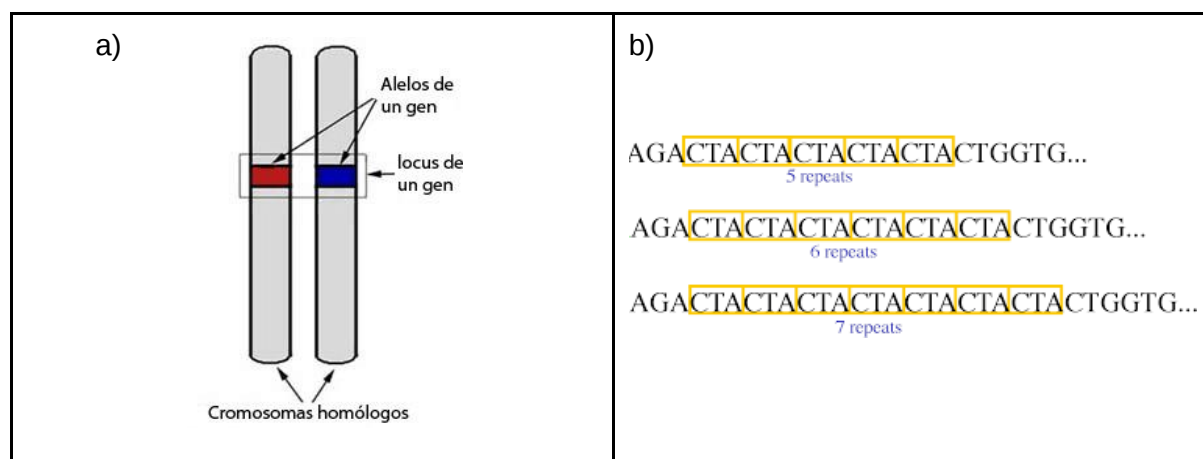


Figura 1. a) Conceptes de locus i al·lel. b) Variant de nombre de repeticions d'un STR

En un **locus** polimòrfic, cada unitat pot estar repetida diferent número de vegades. S'anomenen **al·lels** a les variants (núm. de repeticions) que té cadascun en un mateix locus de cada cromosoma homòleg.

En examinar diversos marcadors, cadascun dels quals presenta múltiples formes al·lèliques, els científics forenses poden construir una "empremta dactilar" genètica única a partir d'una mostra d'ADN. En un anàlisi típic de STR que utilitza uns 13 marcadors, la probabilitat d'un fals positiu (que dues persones tinguin la mateixa "empremta dactilar" d'ADN) és menor a 1 en 10 mil milions (1).

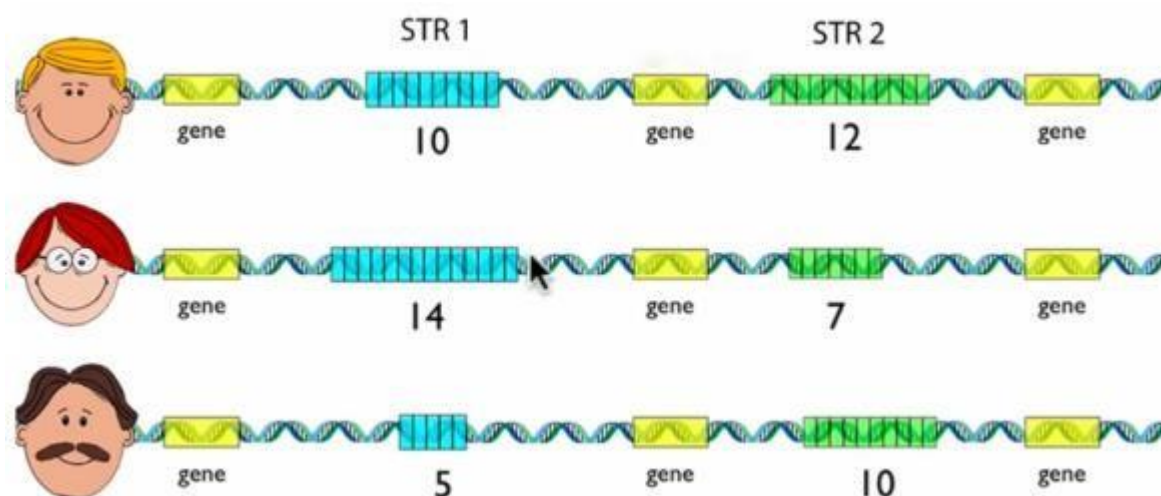


Figura 2. Exemple de STR. Fixem-nos que en aquesta imatge. Estem mirant dos locus diferents. Cada persona té un nombre diferent de repeticions en cada STR. Per tant, si féssim el perfil genètic d'aquestes persones, en l'electroforesi cada persona donaria un perfil diferent.

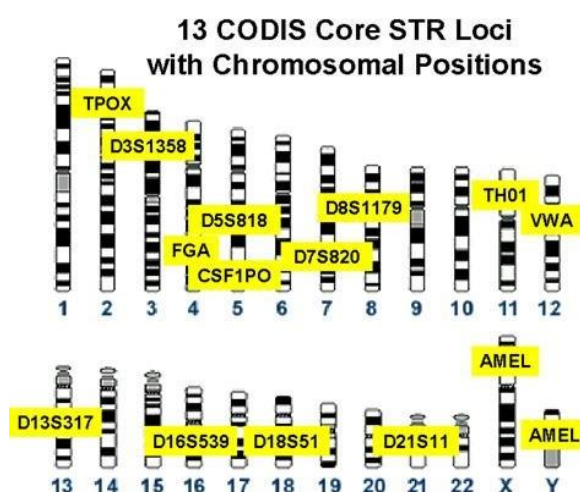


Figura 3. Marcadors genètics usats per CODIS. Aquesta imatge mostra els STR utilitzats en proves forenses i de paternitat segons el sistema CODIS..

Herència genètica dels STR

En realitat, com veiem en la figura 4, per un mateix locus (lloc del cromosoma) podem tenir diversos al·lels (verd, blau, lila i vermell). Cada al·lel té un nombre diferent de repeticions. Heretem un al·lel del pare i un de la mare. En aquest cas la filla té un al·lel blau del pare (amb un nombre de repeticions determinat) i un al·lel lila de la mare (amb un altre nombre de repeticions). Per tant, en aquest cas, quan corren la mostra en el gel d'electroforesi veurem dues bandes de tamanyos diferents. Per això aquesta tècnica és útil per les proves de paternitat.

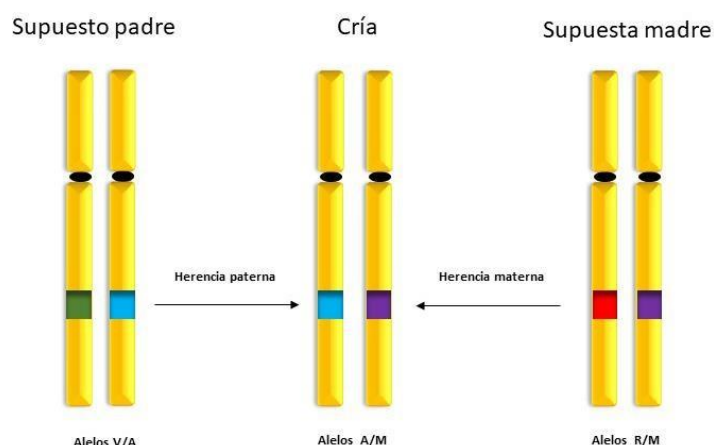


Figura 4. Herència dels STR

Com ja hem vist abans, en funció del nombre de repeticions que tingui cada STR, el fragment amplificat correrà més o menys en el gel d'electroforesi. Exemple. Si el fragment amplificat té moltes repeticions (més pb) correrà poc en el gel.

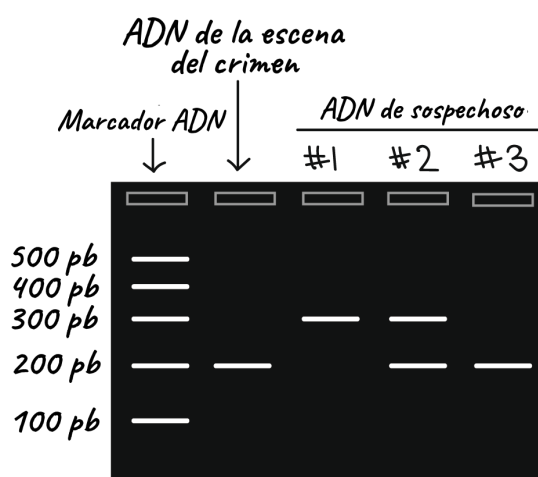


Figura 5. Exemple d'electroforesi d'escena del crim.

Per altra banda, cal tenir en compte que per cada STR necessitem uns primers diferents.

<i>Locus</i>	<i>marker</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
DFNB4	D7S1817	CAAATTGGCAAAAACCTGC	CCCCCATTGAGGTTATTAC
	D7S523	CTGATTCATAGCAGCACTTG	AAAACATTTCCATTACCACTG
	D7S496	AACAACAGTCAACCCACAAT	GCTATAACCTCATAANAAACCAAAA
	D7S501	CACCGTTGTGATGGCAGAG	ATTCTTACCAGGCAGACTGCT
DFNB28	D22S1045	GCTAGATTTCCTCCGATGAT	ATGTAAAGTGCTCTCAAGAGTGC
	D22S445	GTCCATCCGTTTGTGTTTGTTC	TGGATGGAGAGAAGGAATGA
	D22S272	GAGTTTTGTGTTGCTGACAC	AATGCACGACCCACCTAAAAG
	D22S1156	TGAGGTAGTCACACGAGGCA	AATTCAGTGGGCTCCGAGG
DFNB93	D11S1765	CAGAAATGCCACCCAGAGAG	TTCCGGAGTTTGACAATCT
	D11S1975	AGGACACAGCCTGCATCTAG	ACCAGGCATTGCACTAAAAG
	D11S1337	AAGGTGTGAGGATCACTGG	AGCTCATGGGGGCTATT

Based upon STRs physical distance in NCBI Map Viewer and NCBI UniSTS, we selected the STRs and their primers. A panel of 11 different STR

markers was genotyped for DFNB4, DFNB28, and DFNB93 loci, according to the selection criteria including greater heterozygosity values,

Figura 6. Primers per diversos STR. Per amplificar cada STR calen uns primers diferents.

Per exemple, si volem mirar 3 STR posarem 3 parells de primers en la reacció de PCR,

Us deixem alguns videos per ajudar a entendre l'explicació:

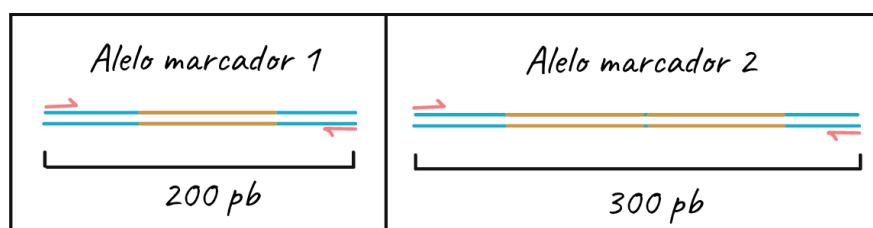
<https://www.youtube.com/watch?v=AJGd9b3jC0Q>

<https://www.youtube.com/watch?v=AkBUriMK9u8>

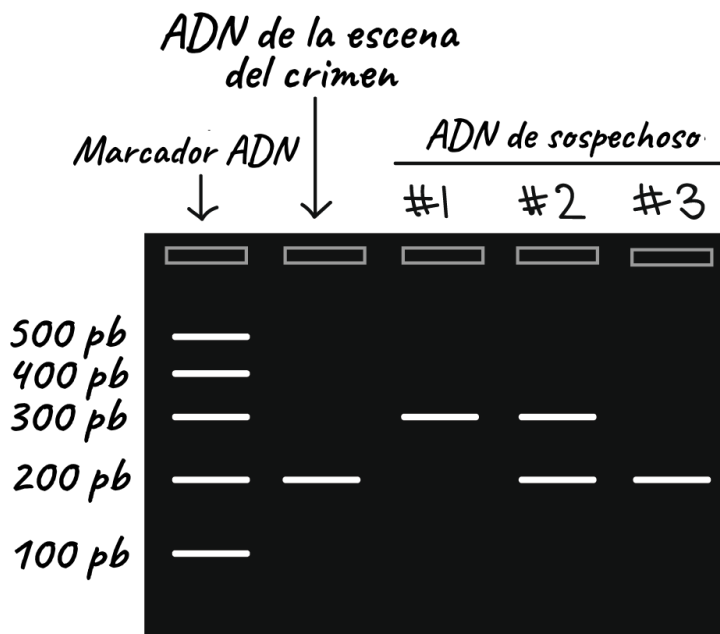
Exemple.

Imagina que treballes en un laboratori forense. Acabem de rebre una mostra d'ADN d'un cabell que es trobava a l'escena d'un crimèn junt amb mostres d'ADN de tres possibles sospitosos. El teu treball és examinar un marcador genètic determinat i veure si algun dels tres sospitosos coincideix amb l'ADN del cabell per a aquest marcador.

En aquest cas el marcador presenta dues versions. Un conté una seqüència repetida una vegada (regió en marró a la següent imatge) i l'altre conté la seqüència repetida dues vegades. En la reacció de PCR amb primers que amplifiquin aquest STR el primer producte serà de 200pb i el segon de 300pb.



Per tant, la PCR obtinguda en aquest cas podria ser:



El sospitós #1 conté dos al·lels amb 2 repeticions.

El sospitós #2 conté un al·lel amb una repetició i un al·lel amb dues repeticions.

El sospitós #3 conté dos al·lels amb 1 repetició.

El perfil d'ADN (en aquest cas només estem mirant un STR) del sospitós #3 coincideix amb el de l'escena del crim, per tant, el sospitós #3 és culpable.

Com més augmenta el nombre de STR observats, més bandes obtindrem a la PCR i més acurat serà l'anàlisi.

A més, estem mirant un STR. Cada STR pot tenir dos al·lels diferents per tant el nombre de bandes que

1. Observa la següent imatge (figura 7):

a. Dels tres sospitosos, identifica quin és l'assassí?

IRIA: Després de la realització de l'electroforesi, hem comprovat que les bandes expressades a la mostra F coincideixen en posició i color amb les bandes de l'individu B. Per tant l'individu B és l'assassí.

CLAU: L'individu B és el culpable, ja que coincideix amb el de l'escena del crim.

JAVI: Les bandes de l'individu B són las que coincideixen amb l'ADN de l'escena del crim, per tant aquesta persona seria l'assassí.

POL: Gràcies a l'electró, comprovem que l'ADN que coincideix amb l'ADN de l'escena del crim, és l'ADN de l'individu B.

VIC: L'assassí d'aquest cas, és l'individu B, ja que les bandes que apareixen en el seu carril, coincideixen completament amb les del carril on hi ha la mostra forense i per tant, es dedueix que és el mateix DNA.

b. Per què els STR tenen diferents tamanys i apareixen en el gel a diverses alçades?

IRIA: Cada mostra d'ADN presenten diferents nombres de bases nitrogenades. Quan col·loquem aquestes mostres en l'electroforesi, permeten que les mostres amb menys bases nitrogenades recorrin majors posicions en el gel que les mostres d'ADN amb una major seqüència de bases. Les mostres amb majors bases fan més pesada la mostra impeditint una major mobilitat en el gel, en canvi les mostres amb menys bases permeten major mobilitat.

CLAU: En funció del nombre de repeticions que tingui cada STR correrà més o menys en el gel, Si el fragment amplificat té moltes pb correrà poc pel gel.

JAVI: Ja que heretem un STR del pare i un altre de la mare podem tenir diferències en els mides, per tant les bandes amb més pes molecular tindran menys mobilitat al gel, al contrari que les menys pesades.

POL: La diferència serà entre la longitud i el parell de bases de cada mostra, que farà que recorrin més o menys a l'hora de fer l'electroforesi.

VIC: La diferencia de mides, es deu al nombre de repeticions dels àcids nucleics del grup en els al·lels i per tant, quan corren en el gel els trobem a diferents alçades, ja que els que contenen més pb (pesen més) queden més a prop dels pous i per contrari, els que contenen menys pb (pesen menys) s'allunyen més dels pous.

c. En aquest cas estem observant 3 STR per tant, quin és el nombre màxim de bandes que podem identificar en el gel per una mateixa persona?

IRIA: Per cada al·lel identifiquem dues repeticions les quals poden ser iguals o no. Si realitzem 3 tipus de STR a la mateixa mostra, el màxim nombre de bandes que podem observar serà sis.

CLAU: Cada al·lel conté dues repeticions, per tant en aquest cas el nombre màxim són 6.

JAVI: En aquest cas observem que els 3 al·lels de cada individu té dues repeticions, per això el màxim de bandes al gel serien 6.

POL: Cada al·lel conte 2 repeticions, com tenim 3 STR aconseguirem 6 bandes a aquesta persona.

VIC: El nombre màxim de bandes que podem identificar per una sola persona, en aquest cas són sis, ja que els al·lels estan duplicats.

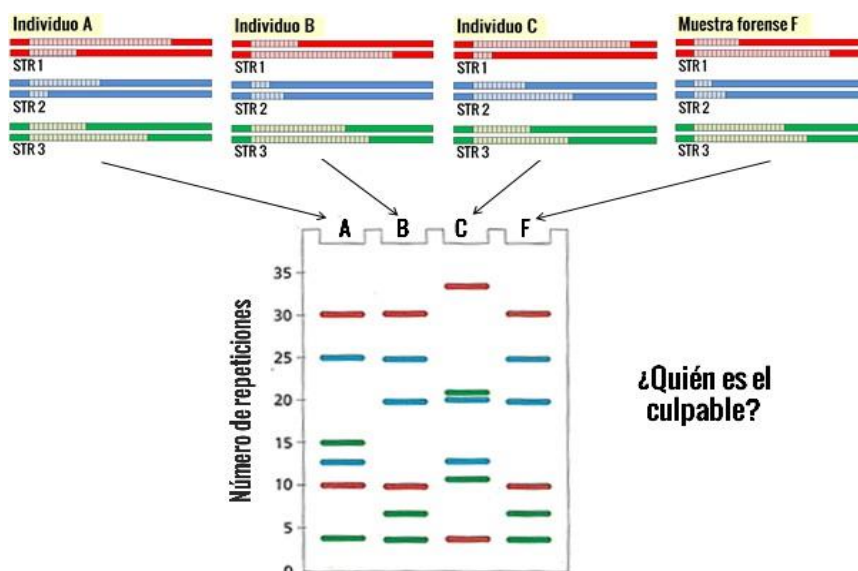


Figura 7. Resultat electroforesi anàlisi STR de l'escena d'un crim.

2. La següent imatge (figura 8) ens indica dos casos de proves de paternitat. Explica per què en el cas A es confirma la paternitat del suposat pare i en el cas B s'exclou la paternitat el pare. Els números que apareixen són el nombre de repeticions d'un determinat STR.

IRIA: En el cas A s'observa que els al·lels del pare són 6/6 i els al·lels de la mare són 4/4, per tant la cria heretarà un al·lel 6 del pare i un al·lel 4 de la mare. Per tant la prova és positiva. D'altra banda, en el cas B s'observa que els al·lels del pare són 6/6 i els al·lels de la mare són 4/4 i la cria presenta al·lels 8/4. Per tant podem deduir que els al·lels del pare no coincideixen amb els al·lels de la cria i els al·lels de la mare sí.

CLAU: En el cas A la prova ha resultat positiva perquè la filla (6/4) conté un al·lel idèntic al de la mare (4/4), i un altre idèntic al del pare (6/6). En canvi en el cas B l'al·lel provinent del pare no és idèntic, per tant la prova en aquest cas és negativa.(8/4)

JAVI: Com es pot observar en el cas A, el nombre de repeticions que ha heretat són els mateixos que els dels suposats pares 6/4, per tant és positiu. D'altra banda en el cas B ha heretat l'ADN de la mare només, ja que representa els seus STR però no coincideixen amb els del pare.

POL: En el cas A l'home en tenir 6/6 li dóna al seu fill un del seu número representant una part del seu ADN i la dona en tenir 4/4 li dóna l'altra part (resultat que dóna un fill 6/4), però en el cas B l'home tindrà un 6/6, la dona un 4/4 i el fill 8/4, el que dóna per pensar que el fill en aquest cas no té cap relació amb l'home.

VIC: Per una banda, en el cas A, l'home té els al·lels 6/6 i la dona té els al·lels 4/4, per tant, es confirma la paternitat, ja que els al·lels del fill coincideixen cada un amb un dels progenitors (ha heretat el 6 del pare i el 4 de la mare). Per l'altra banda, en el cas B, no es confirma la paternitat, ja que el fill té els al·lels 8/4 i aquests no coincideixen amb l'al·lel que hauria d'heretar del suposat pare que és 6 i no 8.

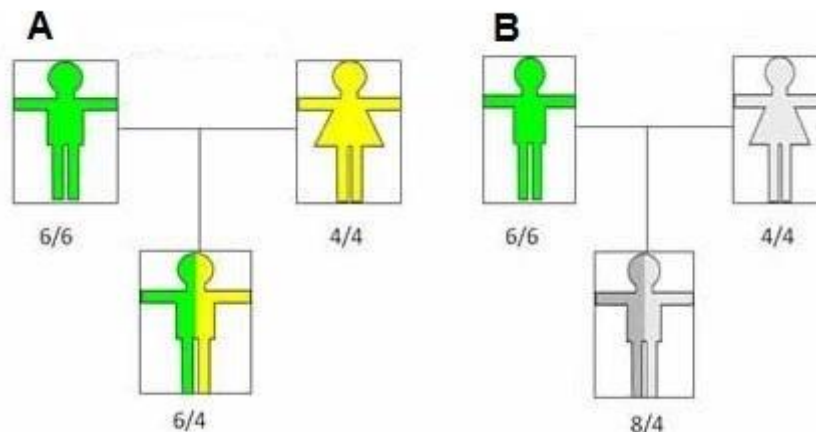


Figura 8. Proves de paternitat

3. Com hem vist, segons els STR que vulguem identificar obtindrem més o menys bandes a l'electroforesi. Ompliu la següent taula:

IRIA	
Nombre de STR	Nombre màxim de bandes observades per una mateixa persona
1	2
4	8
6	12
10	20
15	30

CLAU	
Nombre de STR	Nombre màxim de bandes observades per una mateixa persona
1	2
4	8
6	12

10	20
15	30

JAVI	
Nombre de STR	Nombre màxim de bandes observades per una mateixa persona
1	2
4	8
6	12
10	20
15	30

POL	
Nombre de STR	Nombre màxim de bandes observades per una mateixa persona
1	2
4	8
6	12
10	20
15	30

VIC	
Nombre de STR	Nombre màxim de bandes observades per una mateixa persona
1	2
4	8
6	12
10	20
15	30

PART GRUPAL

Arribem a l'escena del crim del cas Clotenc Erlenmeyer. L'assassí, per sortir de l'escena del crim va trencar una finestra i va saltar per ella. En sortir, es va tallar amb un vidre i es va ferir.

Recollim mostra de sang que hem trobat en aquesta mateixa finestra. Ens anirà genial per fer un anàlisi de STR i comparar-ho amb l'ADN dels nostres sospitosos. Recordeu que al principi del Repte va pensar tres possibles sospitosos?

1. **Extracció i purificació d'ADN.** Arribem al laboratori i fem l'extracció d'ADN per solvents orgànics.

L'obtenció d'àcids nucleics purificats comença amb el pretractament de la mostra, per a procedir amb la següent etapa hem de realitzar una lisi cel·lular per alliberar-los, com també la inactivació de les nucleases cel·lulars les quals poden degradar els àcids nucleics. Tot això s'aconsegueix mitjançant la incubació de la suspensió cel·lular amb una solució de lisi. Aquesta solució està formada per detergents, EDTA, proteases i agents caotròpics.

El resultat que obtenim al finalitzar aquests processos és una lisi cel·lular homogènia, això implica que els àcids nucleics estan barrejats amb un extracte cel·lular de proteïnes, sals minerals, components cel·lulars solubles i reactius del procés d'extracció.

L'última etapa necessària és la purificació, per a separar els àcids nucleics de la resta de components del lisat cel·lular. Existeixen diverses tècniques per dur a terme aquest procés. Esmentem el mètode de purificació amb solvents orgànics, aquest es basa en la diferent solubilitat dels compostos que integren el lisat cel·lular en solvents orgànics.

La primera fase és l'eliminació de compostos solubles en aquests solvents. Les proteïnes i els lípids es sentiran atrets pels solvents orgànics, el DNA i RNA es sentiran atrets pel solvent aquós, com també les sals i altres, que hauran de ser eliminades posteriorment.

La següent fase és la precipitació del DNA, farem servir l'alcohol, el qual és un agent deshidratant que elimina l'aigua que envolta les molècules d'ADN. La darrera fase és el rentat del DNA, L'ADN és insoluble en etanol, però les sals i altres contaminants, si que es dissolen en etanol, per tant la mostra queda més pura. Per finalitzar s'acaba resuspenet en aigua o en tampó Tris-EDTA.

Per a comprovar la puresa dels àcids nucleics, han de passar per un control de qualitat, en el que, gràcies als valors de referència, determinarem si aquest procés s'ha realitzat de manera correcta, en el cas de no ser així, hauriem de repetir-lo.

2. **Concentració de la mostra.** Un cop tenim l'ADN volem determinar la concentració de mostra que tenim i la quantitat total, Hem obtingut 100µl d'ADN i per calcular la concentració diluim 10µl en 980µl de TE. Anem a l'espectrofotòmetre i obtenim els valors de la taula. Calculeu:

- a. La concentració de la solució original en ng/µl

$$A_{260} - A_{320} = 0,351$$

$$X = 0,351 \text{ uA} \times 50 \text{ ng/ul} / 1 \text{ uA} = 17,55 \text{ ng/ul}$$

$$\text{Escala} = 10/1000 = 1/100$$

$$17,55 \text{ ng/ul} \times 100 = 1755 \text{ ng/ul}$$

- b. La quantitat total de DNA en µg en la solució original.

$$100 \text{ ul DNA inicial} \times 1755 \text{ ng} \times 1 \text{ ug} / 1000 \text{ ng} \times 1 \text{ ul ADN} = 175,5 \text{ ug}$$

MOSTRA
$A_{260} = 0,369$
$A_{280} = 0,285$
$A_{320} = 0,018$

3. **Fem la PCR.** El següent pas serà fer la PCR. En aquest cas volem mirar 5 STR i farem servir el següent kit. Ompliu la taula:

Components de la PCR (amb les corresponents concentracions stock)	Casa comercial proveïdora de cada producte i número de referència	Concentració final al tub de PCR de 50 µl	Volum inicial al tub de PCR de 50 µl	Càlculs de la MASTER MIX per a X tubs (6 tubs)
Buffer (10x) Format per: 160mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl, 0,1% Tween-20, pH8,8	Ja el comprem preparat, tot i que es podria preparar al Lab.	1x	5 µl	30 µl
MgCl₂ (50mM)	Sigma	2,5 mM	2,5 µl	15 µl

Primer F (50 µM) STR1	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer R (50 µM) STR1	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer F (50 µM) STR2	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer R (50 µM) STR2	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer F (50 µM) STR3	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer R (50 µM) STR3	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer F (50 µM) STR4	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer R (50 µM) STR4	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer F (50 µM) STR5	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Primer R (50 µM) STR5	Invitrogen	1 µM	1 µl	6 µl
Taq polymerase (5 U/µL)	BIOLINE (BIO-21040) Manual	0,03 U/µL	0,3 µl	1,8 µl
dNTP Mix (2,5mM)	BIOLINE (BIO-39044) Manual	0,4 mM	8 µl	48 µl
H2O RNase Free	Sigma W4502	--	22,2 µl	133,2 µl
DNA genòmic pur (agafeu la concentració inicial que heu obtingut a la pregunta anterior)		2ng/µl	2 µl	NOO! Mai es posa DNA a la MASTER MIX, la posarem als tubs de PCR directament.
VOLUM TOTAL		--	50 µl	288 µl

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Buffer: $10 \cdot X = 1 \cdot 50 \rightarrow X = 5 \mu\text{l} \cdot 6 = 30 \mu\text{l}$

MgCl₂: $50 \cdot X = 2,5 \cdot 50 \rightarrow X = 2,5 \mu\text{l} \cdot 6 = 15 \mu\text{l}$

Primer: $50 \cdot X = 1 \cdot 50 \rightarrow X = 1 \mu\text{l} \cdot 6 = 6 \mu\text{l}$

Taq polymerase: $5 \cdot X = 0,03 \cdot 50 \rightarrow X = 0,3 \mu\text{l} \cdot 6 = 1,8 \mu\text{l}$

dNTP Mix: $2,5 \cdot X = 0,4 \cdot 50 \rightarrow X = 8 \mu\text{l} \cdot 6 = 48 \mu\text{l}$

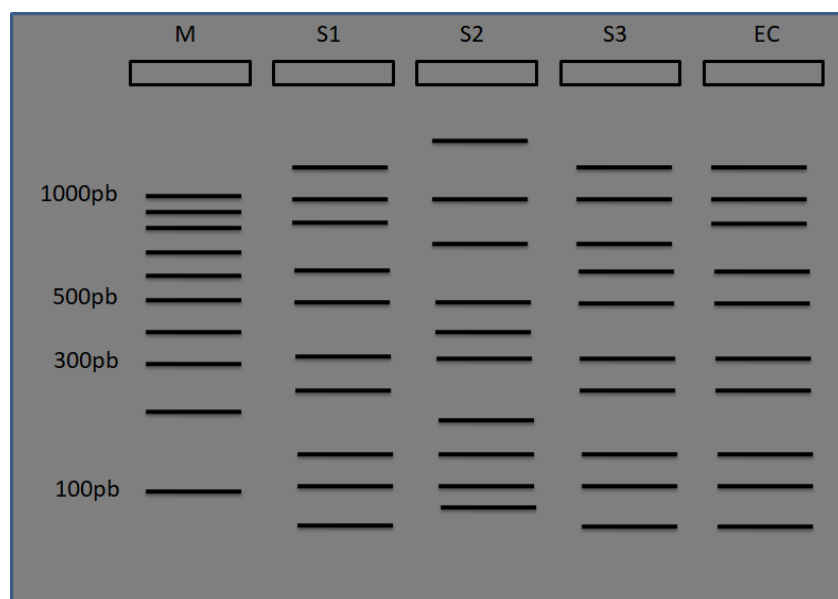
H₂O RNase Free: $5 + 2,5 + (1 \cdot 10) + 0,3 + 8 + 2 = 27,8 \rightarrow 50 - 27,8 = 22,2 \mu\text{l} \cdot 6 = 133,2 \mu\text{l}$

4. Quina variant (tipus) de PCR estem fent?

STR: Consisteix en una seqüència d'ADN format per un parell de bases (2-6), amplifiquades entre 5-50 vegades, l'amplificació per ser realitzada és necessari tenir uns primers, aquests fragments són separats a través de l'electroforesi segons la seva longitud. Aquesta variació és utilitzada normalment en crims per a comparar mostres d'ADN d'escenes del crim amb l'ADN dels sospitosos.

5. Ja tenim els resultats! Qui és l'assassí en aquest cas?

En aquest resultat l'assassí és el sospitós número 1, ja que és la mostra que coincideix amb un 100% amb la de l'escena del crim i totes dues tenen el mateix nombre de repeticions i al·lels.



M: Marcador

S1:ADN sospitós #1

S2: ADN sospitós #2

S3: ADN sospitós #3

EC: ADN escena crim

El sistema CODIS i les bases de dades de DNA

La recopilació i l'emmagatzematge de proves d'ADN pot ser de gran ajuda en l'aplicació de la llei. El sistema d'índexs COMbined DNA (CODIS) és un sistema federal dels EUA de base de dades d'ADN obtingudes a partir d'escenes de crims i de culpables violents condemnats. CODIS treballa a nivell federal, estatal i local i està mantingut per l'FBI.

Tot i que CODIS va ser dissenyat originalment per recollir informació sobre criminals violents, molts estats han promulgat legislació que permet la recopilació de proves d'ADN, fins i tot si aquesta persona no està condemnada per un delict.

Com es pot observar a la següent figura, el CODIS identifica marcadors genètics en 13 STR, a més del locus de l'amelogenina (present en cromosomes X i Y i adequat per determinar el sexe).

Figura 9. Marcadors genètics usats per CODIS.

6. Quins problemes ètics-jurídics planteja el fet que existeixin aquestes bases de dades de perfils genètics?

Pot ser cert el fet que aquest tipus de plataformes ens beneficien quan la necessitat d'identificar una mostra d'ADN és present, però què implica que el govern pugui tenir a l'abast tota aquesta informació?

Ens remuntem al mateix conflicte de sempre, el control per part de l'Estat, i tot el que comporta. Ser partidàries que l'Estat tingui el poder de controlar tota mena d'informació, incloent-hi la informació genètica de les ciutadanes, és acceptar els discursos paternalistes que la major part dels dirigents ens ofereixen. No considerem ètic el fet que una part minúscula de la societat tingui a l'abast tota mena de privilegis i recursos per assegurar la protecció de la comunitat, ja que l'únic que comporta és que vivim sota un règim controlador on no signifiquem res més enllà d'unes simples xifres.

També cal esmentar la repercussió del que representa "prendre mostres" sense el consentiment previ de l'individu. Dins l'àmbit jurídic, podria haver-hi molts problemes si aquests sistemes s'apliquessin de manera més habitual, ja que avui en dia no pots recollir mostres d'una persona sense que aquesta sigui informada, la globalització d'aquestes plataformes podria comportar la violació de la protecció de dades de cada subjecte.

- (1) Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. y Jackson, R. B. (2011). Forensic evidence and genetic profiles (Evidencia forense y perfiles genéticos). (10° ed., págs. 430-431). San Francisco, CA: Pearson.