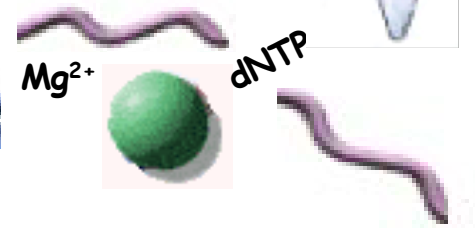


LA PCR

COMPONENTI di una REAZIONE di PCR

Stampo ⇒ DNA a doppio filamento



Primers ⇒ Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio

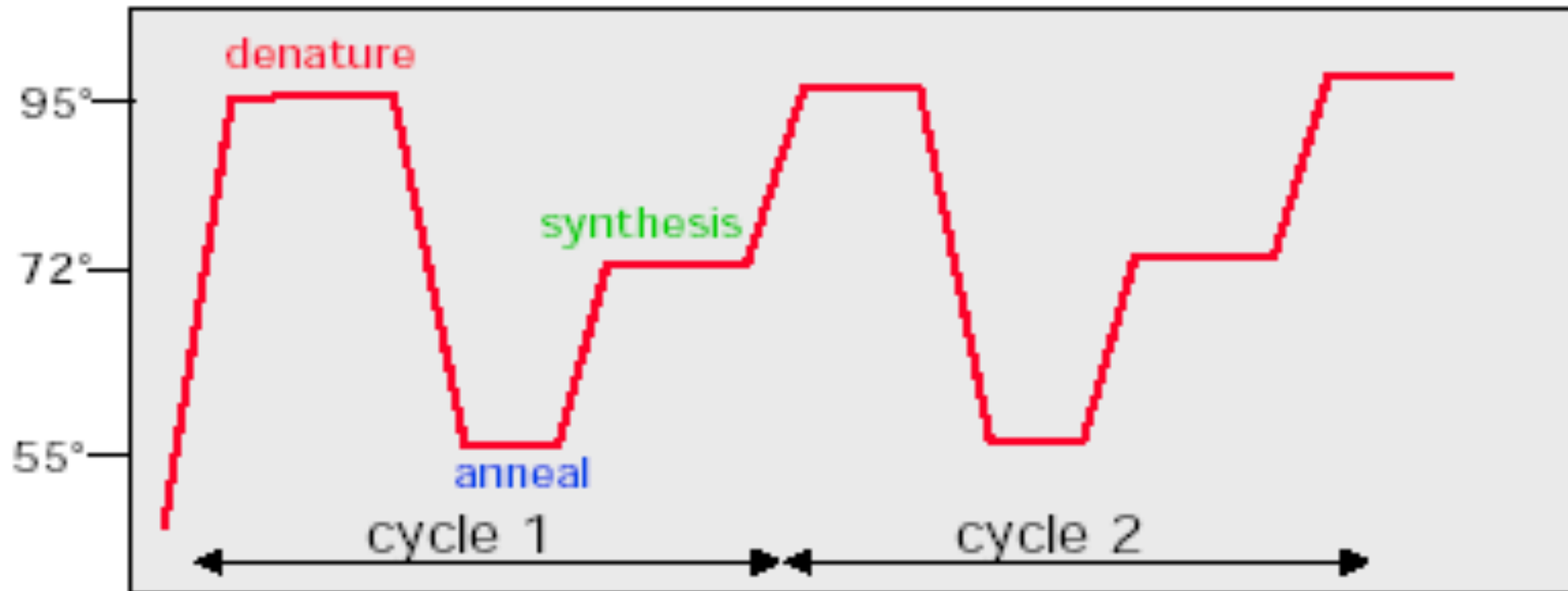
Deossiribonucleotidi trifosfati ⇒ Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP

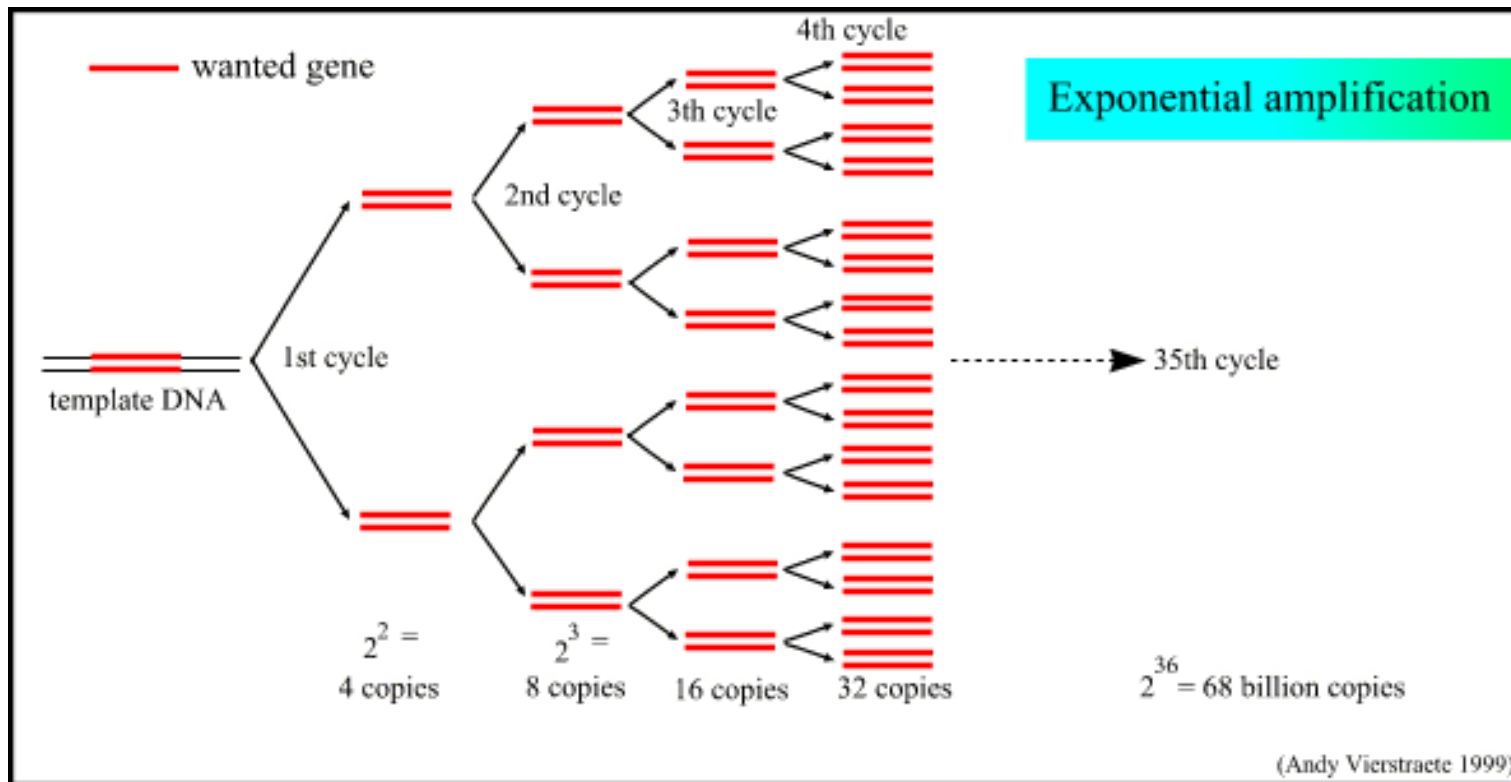
Tampone contenente cloruro di magnesio ⇒ Lo ione Mg^{2+} è essenziale per il funzionamento dell'enzima

Enzima ⇒ Tradizionalmente viene usata la *Taq* polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*

PCR: il processo

La PCR si organizza in cicli durante i quali avviene il processo di amplificazione del DNA. Tale processo, richiede una ciclica variazione della temperatura e viene realizzato in automatico da apposite macchine, che realizzano fino a 35 cicli in un'ora.





• Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

Numero di cicli	Numero di molecole di amplificati
1	• 2
2	• 4
3	• 8
4	• 16
5	• 32
6	• 64
7	• 128
8	• 256
9	• 512
10	• 1.024
11	• 2.048
12	• 4.096
13	• 8.192
14	• 16.384
15	• 32.768
16	• 65.536
17	• 131.072
18	• 262.144
19	• 524.288
20	• 1.048.576
21	• 2.097.152
22	• 4.194.304
23	• 8.388.608
24	• 16.777.216
25	• 33.554.432
26	• 67.108.864
27	• 134.217.728
28	• 268.435.456
29	• 536.870.912
30	• 1.073.741.824

$$Y = N \cdot 2^n$$

Y= numero molecole di DNA amplificato
N= numero molecole di DNA di partenza
n= numero dei cicli di PCR

I primi 4 cicli della PCR in dettaglio

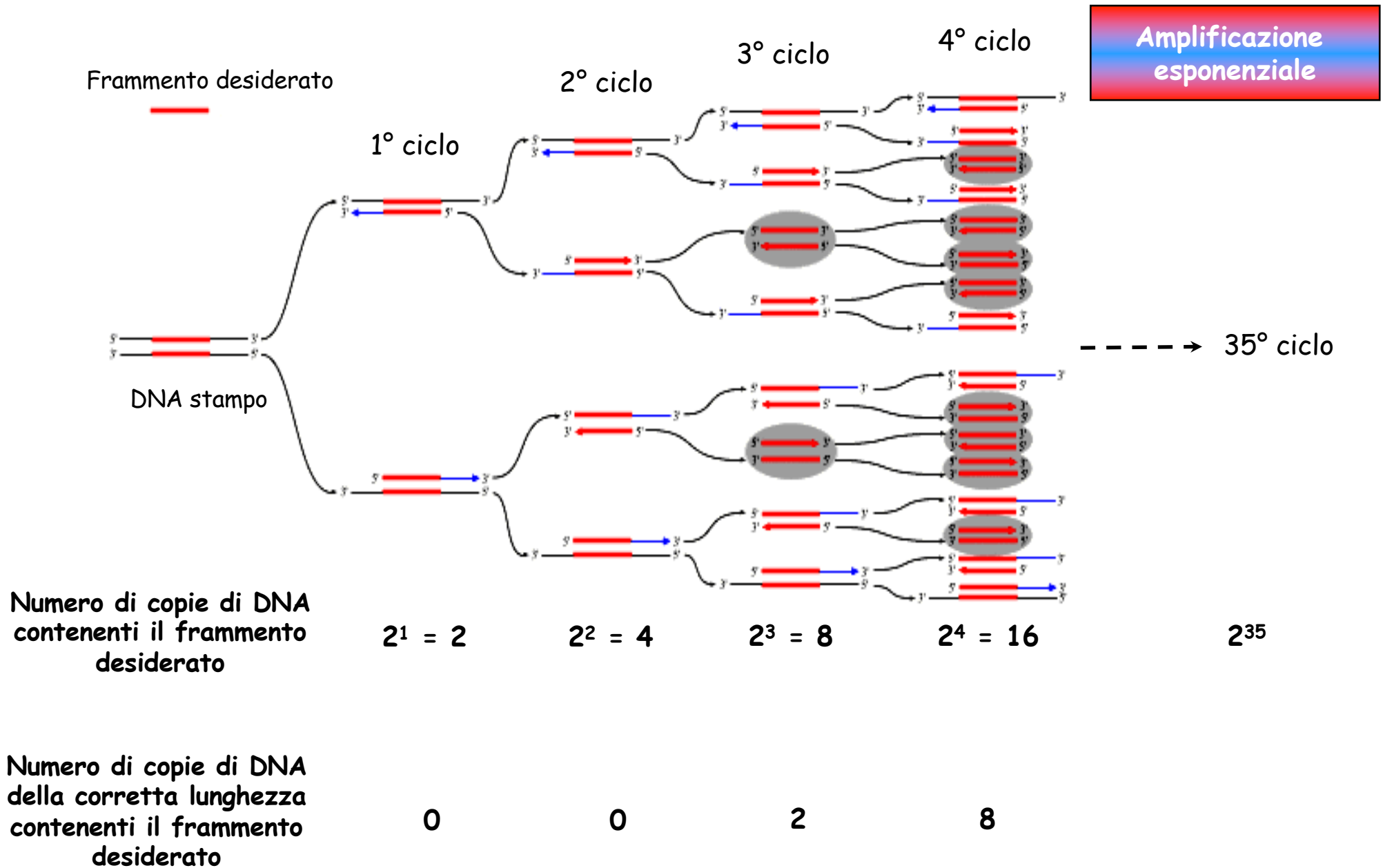


Figure 4: PCR Phases in Log view

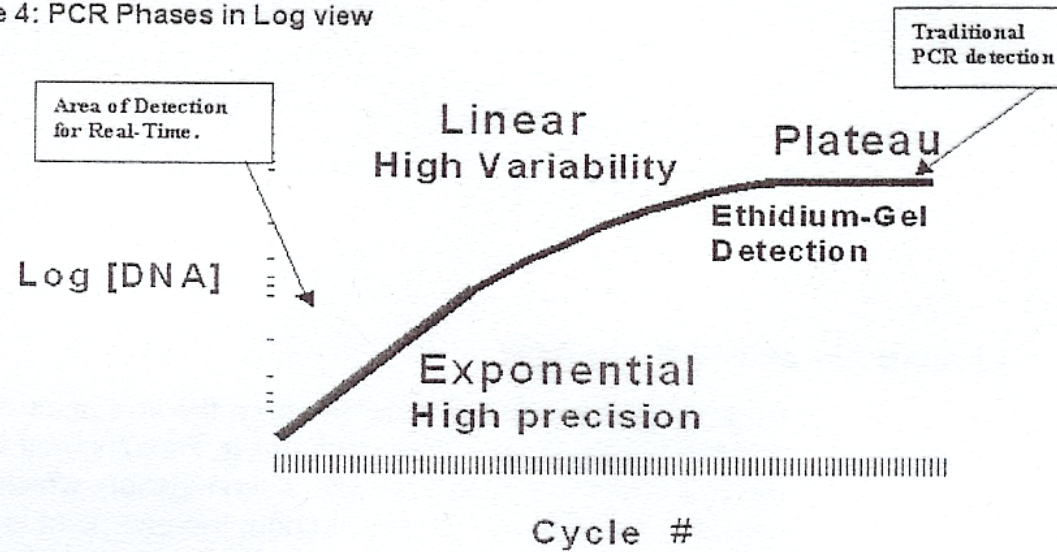
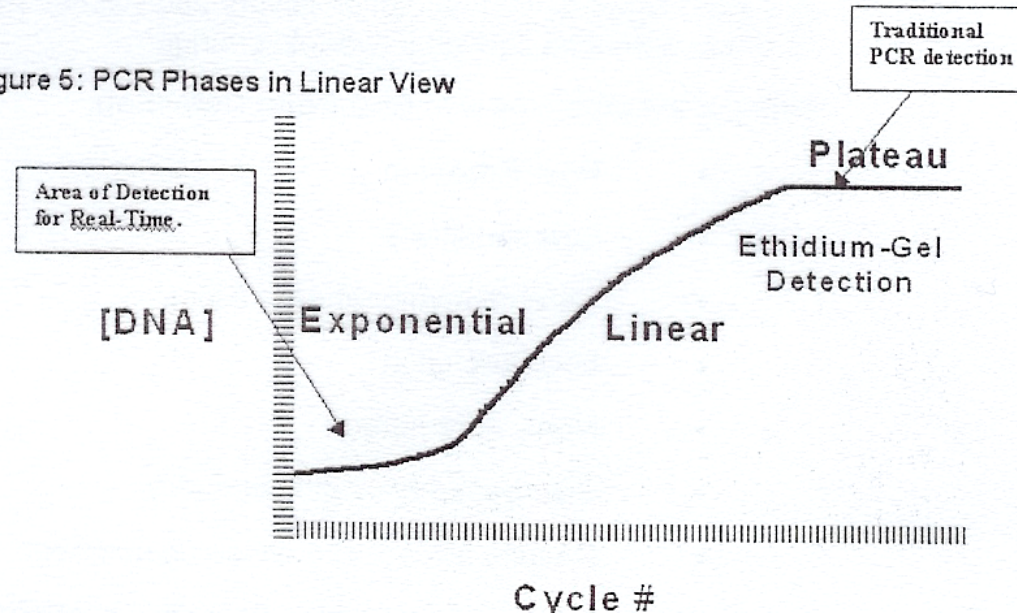


Figure 5: PCR Phases in Linear View



Per ottenere buoni risultati con la PCR è essenziale progettare in modo accurato gli oligonucleotidi (primer) più adatti allo scopo (specificità del riconoscimento) e che serviranno da innesco alla DNA polimerasi durante la reazione di amplificazione.

Nella fase di progettazione dei primer è fondamentali considerare una serie di fattori:

- ❖ specificità di appaiamento
- ❖ lunghezza (18-25 bp)
- ❖ contenuto in GC (circa 60%);
- ❖ T_m : è opportuno che siano molto vicine
- ❖ verificare la possibile formazione di strutture secondarie complesse nei primer
- ❖ l'estremità 3' del primer deve terminare con una GC ma non averne più di 3 consecutive.

Inoltre, per un'eventuale ottimizzazione delle condizioni, è utile realizzare reazioni di messa a punto della PCR con gradiente di temperatura di annealing. L'aggiunta di altri fattori, quali sali e denaturanti o detergenti, può influire sulla stringenza e sulla specificità di appaiamento.

PROGETTAZIONE dei PRIMERS

Caratteristiche di un buon primer:

✓ **Lunghezza: 16 bp o più** ↗

Una sequenza di 16 bp sarà statisticamente presente solo una volta ogni 4^{16} bp (~ 4 miliardi di basi) corrispondenti circa alla grandezza del genoma umano.

✓ **T_m primer 1 \approx T_m primer 2**

La T_m dipende dalla **lunghezza** e dalla **sequenza** del primers

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ C$$

$T_{annealing}$ \Rightarrow $\sim 2-5^\circ C$ al di sotto della più bassa T_m dei due primers usati

! Se la T_a dei due primers è molto diversa si possono verificare amplificazioni asimmetriche o a singolo filamento.

✓ **Assenza di sequenze ripetute invertite che possano far ripiegare il primers su se stesso o di sequenze complementari fra i primers che causano l'amplificazione di dimeri dei primers**

I FATTORI CRITICI della PCR

Non utilizzare quantità eccessive di stampo, primers e/o dNTP al fine di evitare amplificazioni non specifiche.

Selezionare l'enzima più idoneo alle proprie necessità

Temperatura di denaturazione: 91-97°C, a seconda della complessità dello stampo. Si deve tener conto che emivita *Taq* polimerasi: **30 min a 95°C**= 30 cicli da 1 min di denaturazione

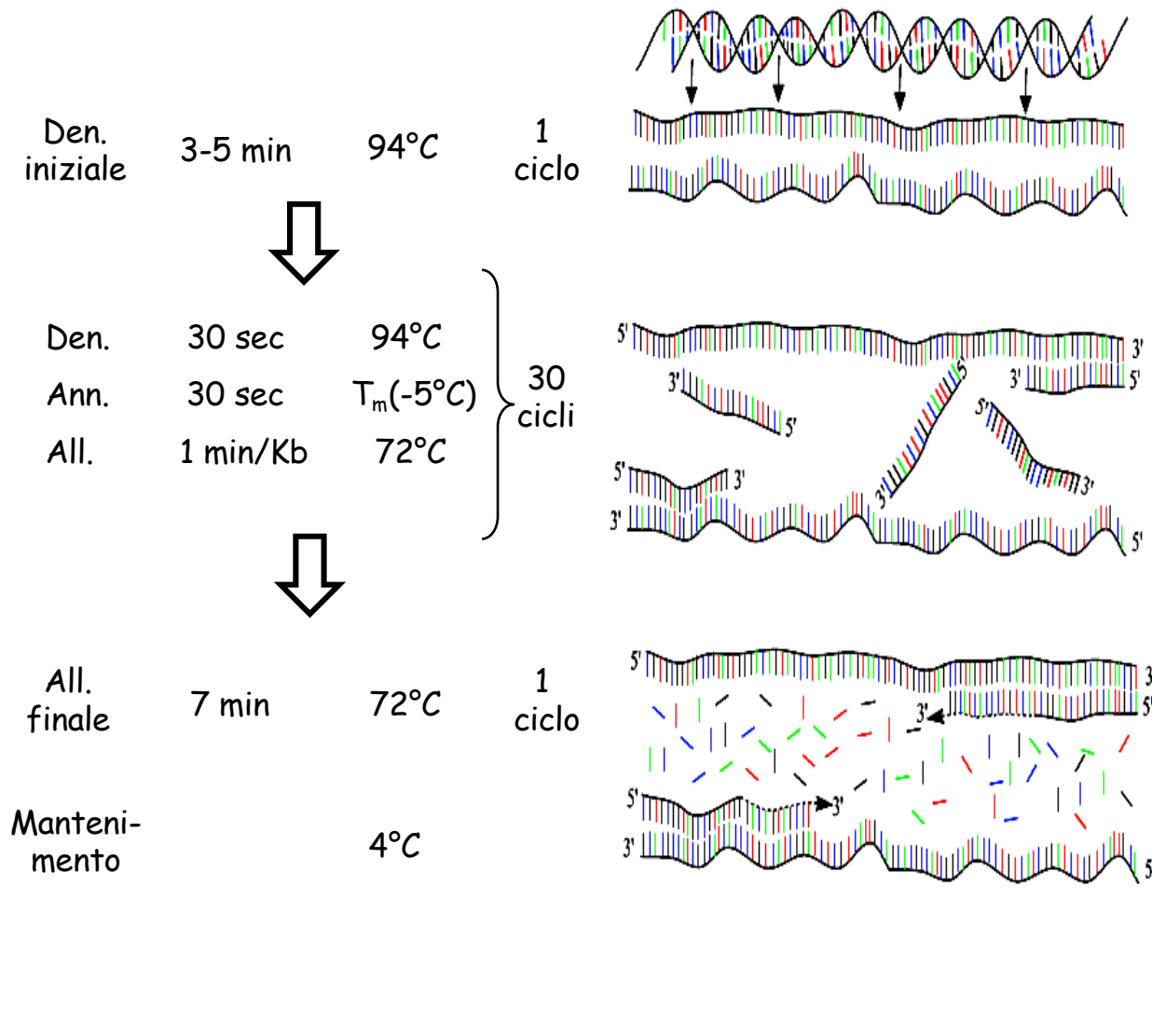
Temperatura e tempo di annealing: T annealing bassa darà reazioni aspecifiche, T annealing alta darà poco prodotto. Si deve pertanto trovare un compromesso.

Temperatura e tempo di extension (allungamento). Compreso tra 68 e 72 °C, a seconda dell'enzima. Si deve tener conto che in 1 min si fa 1 KB di amplificato.

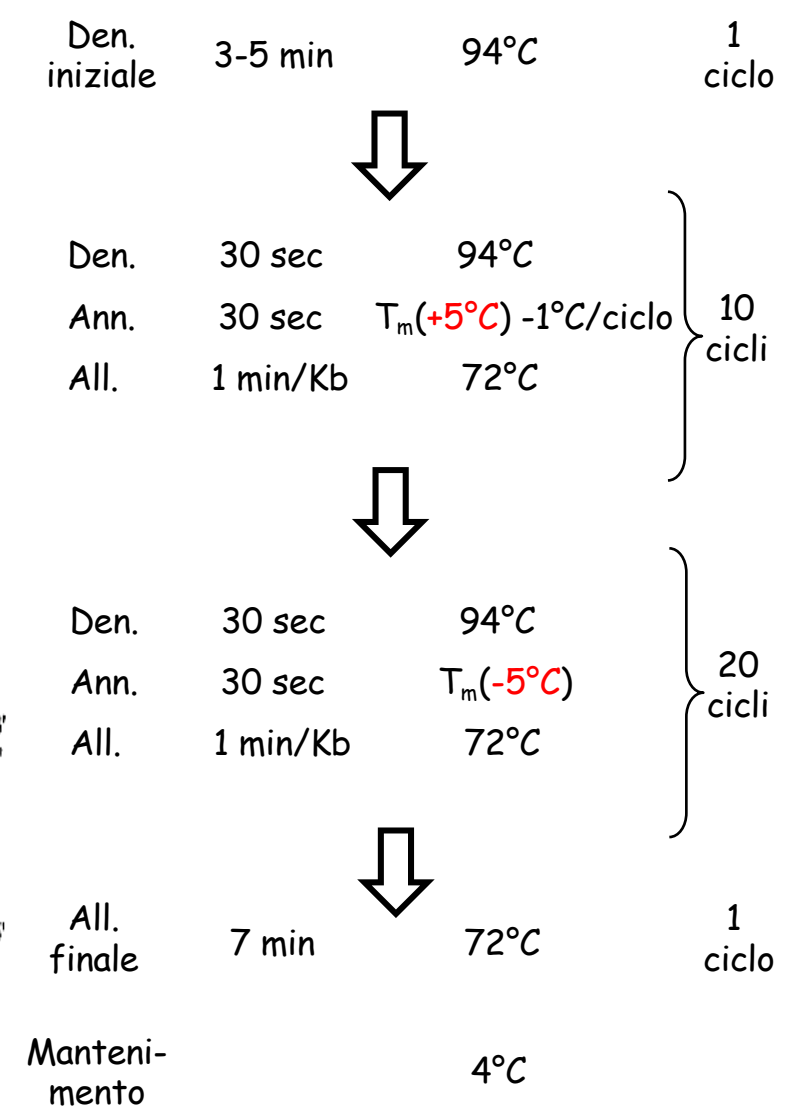
Il numero dei cicli dipende dalla concentrazione dello stampo iniziale. Spesso non si può conoscere e si utilizzano di media 30 cicli.

STRATEGIE per AUMENTARE la SPECIFICITA'

PCR CLASSICA



TOUCHDOWN PCR



...STRATEGIE per AUMENTARE la SPECIFICITA'

HOT START

Perché realizzare una PCR "hot start"?

Durante l'allestimento della reazione di PCR o durante il riscaldamento iniziale del campione si possono verificare situazioni di appaiamento non specifico fra primers e stampo.

Fra 40 e 50°C la *Taq* polimerasi ha un'efficiente attività polimerasica e può estendere i primers non correttamente appaiati.

La PCR "hot start" previene la formazione di questi prodotti non specifici in quanto un componente chiave della miscela di reazione (enzima o $MgCl_2$) viene aggiunto dopo lo step di denaturazione iniziale.

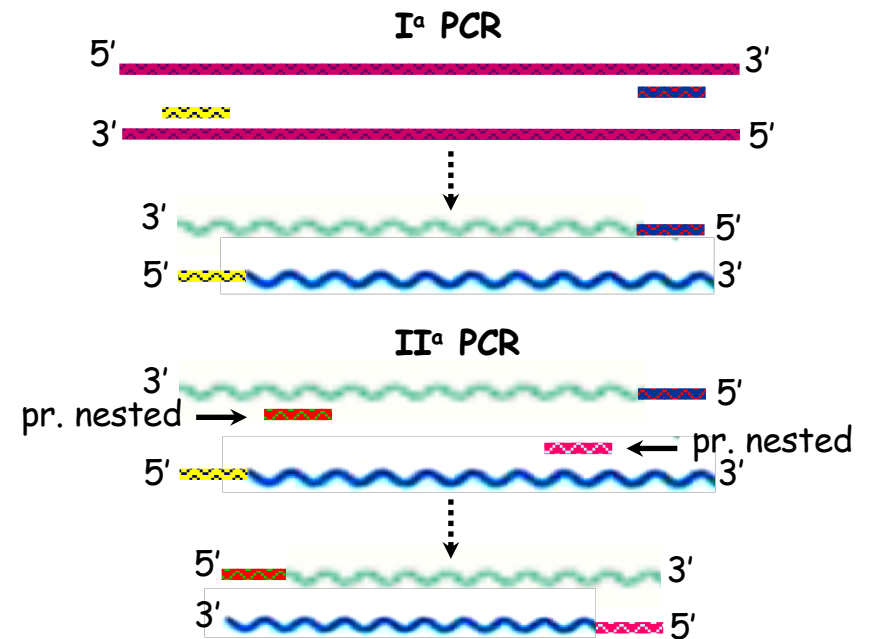
NOVITA':
Enzimi "Hot start"
Gocce di cera



NESTED PRIMER PCR

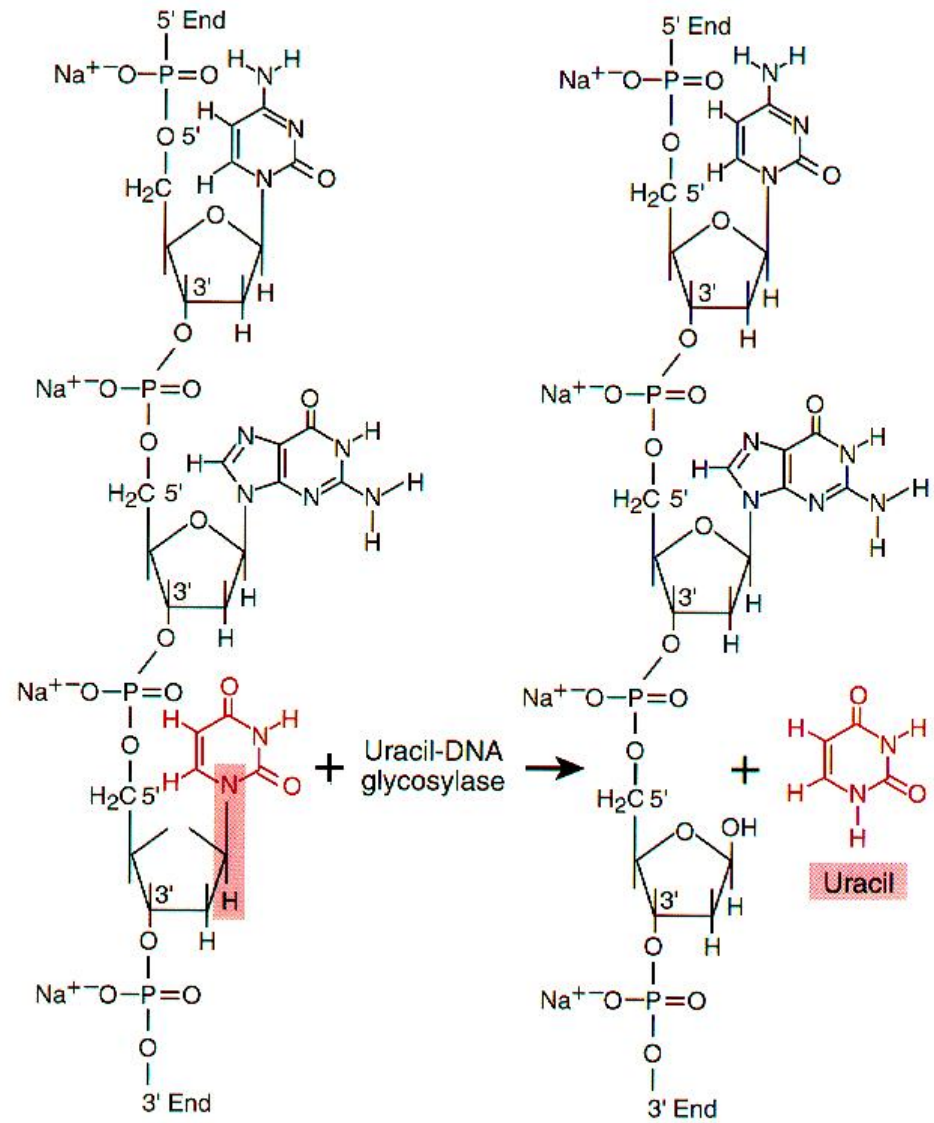
Procedura:

- ✓ L'amplificazione è realizzata con un set di primers
- ✓ Il prodotto è riamplicato con un set di primers interni ai precedenti



I prodotti non specifici amplificati nella Iª PCR non saranno amplificati nella IIª

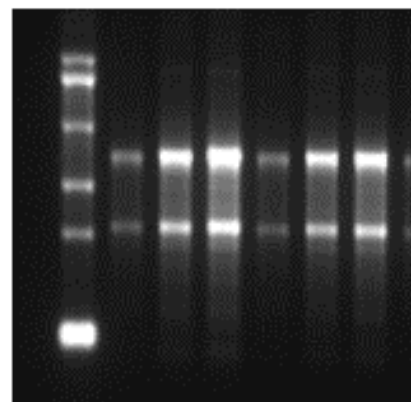
Uso della Uracil-N-glicosilasi e di UTP per evitare contaminazioni delle PCR o RT-PCR da parte degli amplificati



Characterisation of the transcriptome

RNA sub-classes in a mammalian cell:

ribosomal RNA	rRNA	80-85%	<i>(5S, 18S und 28S)</i>	
transfer RNA	tRNA	10-15%		
messenger RNA	mRNA	1-5%		
average length	1930 bases			
high abundant	<10 genes	10-20000 copies/cell	>1%	
intermediate abundant	~500 genes	200-400 copies/cell	0,1%	
low abundant	>10000 genes	<20 copies/cell	0.004%	

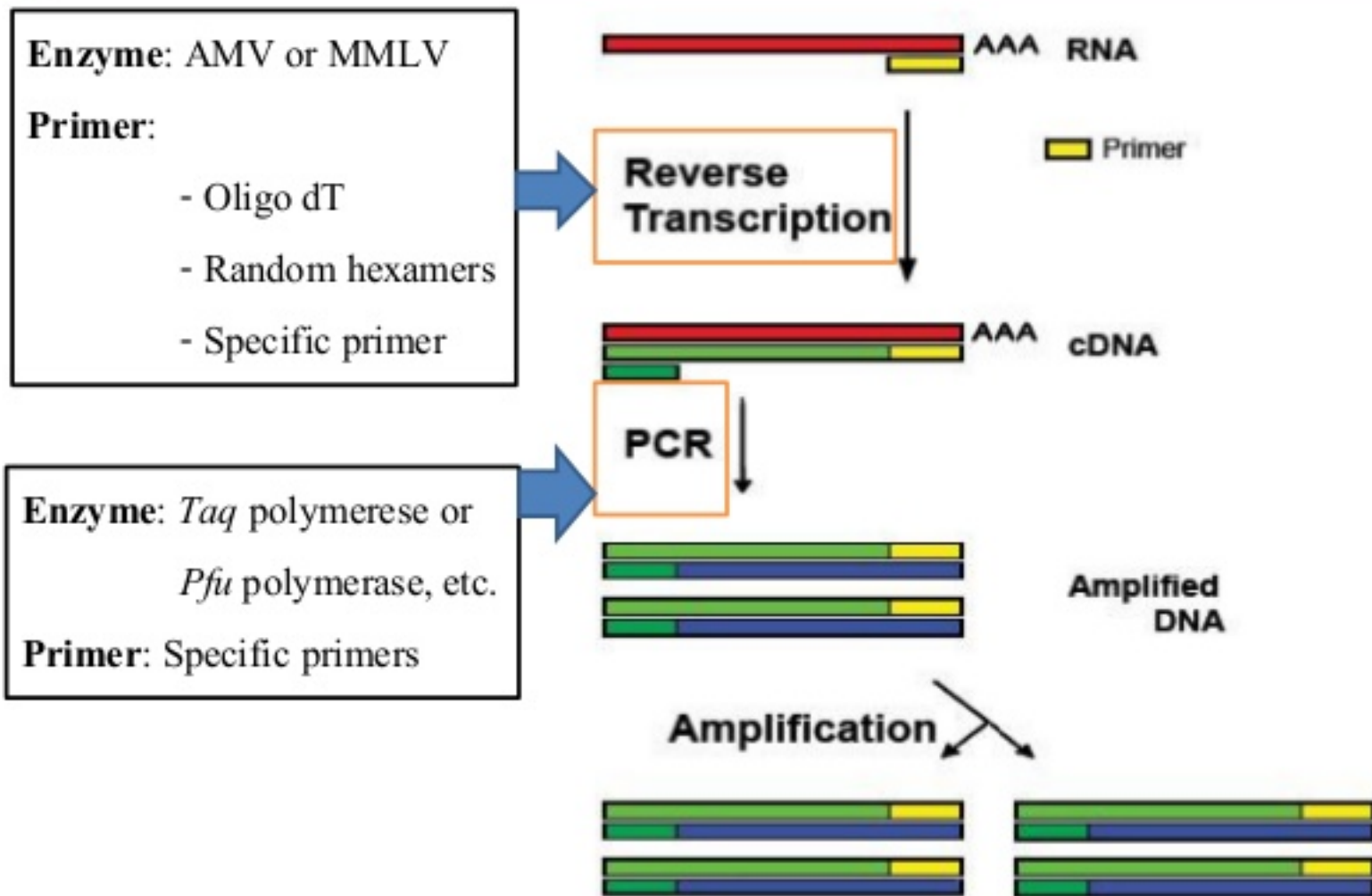


← 28S rRNA 3898-6333 bases

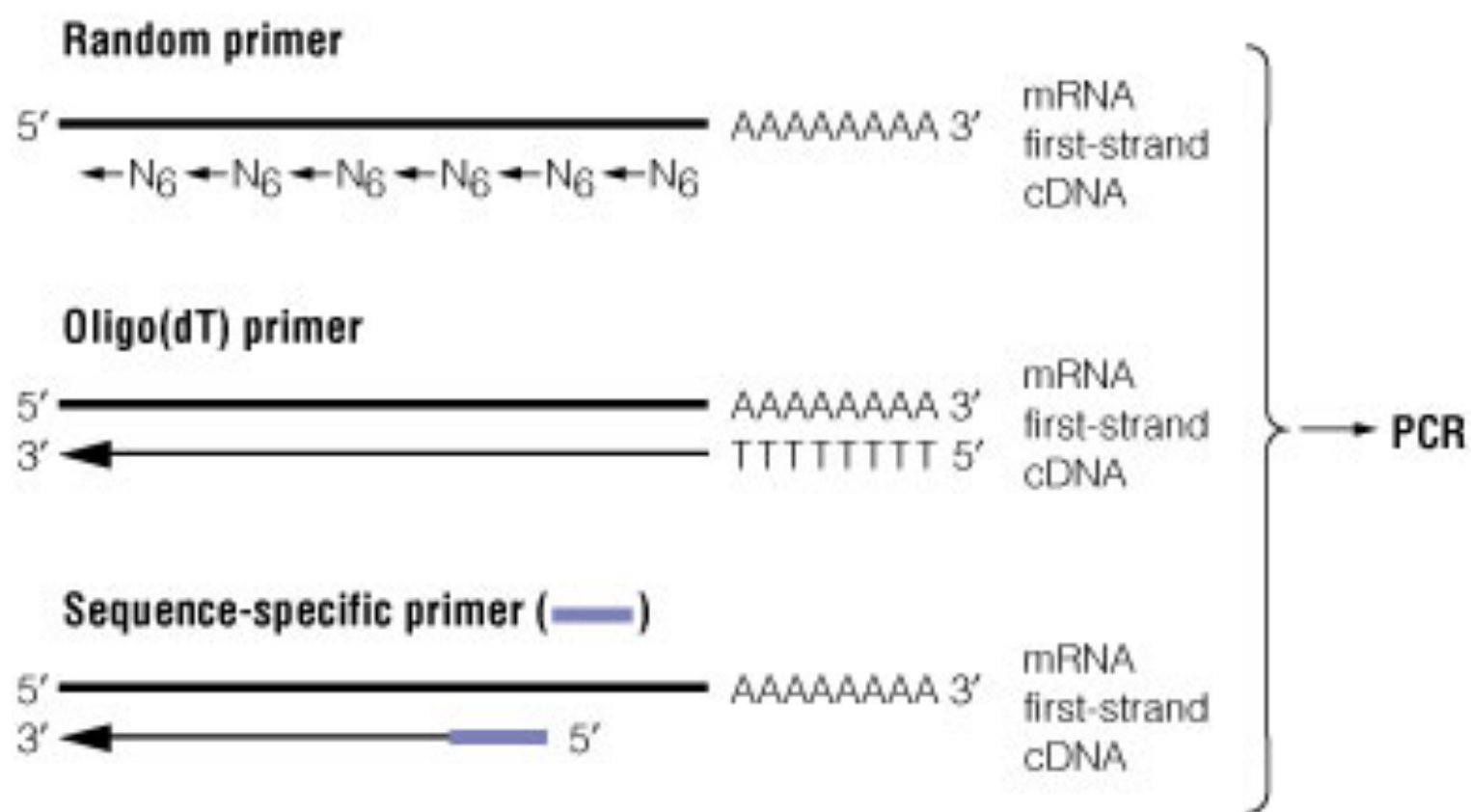
← 18S rRNA 1898-1976 bases

← 5S rRNA ~120 bases

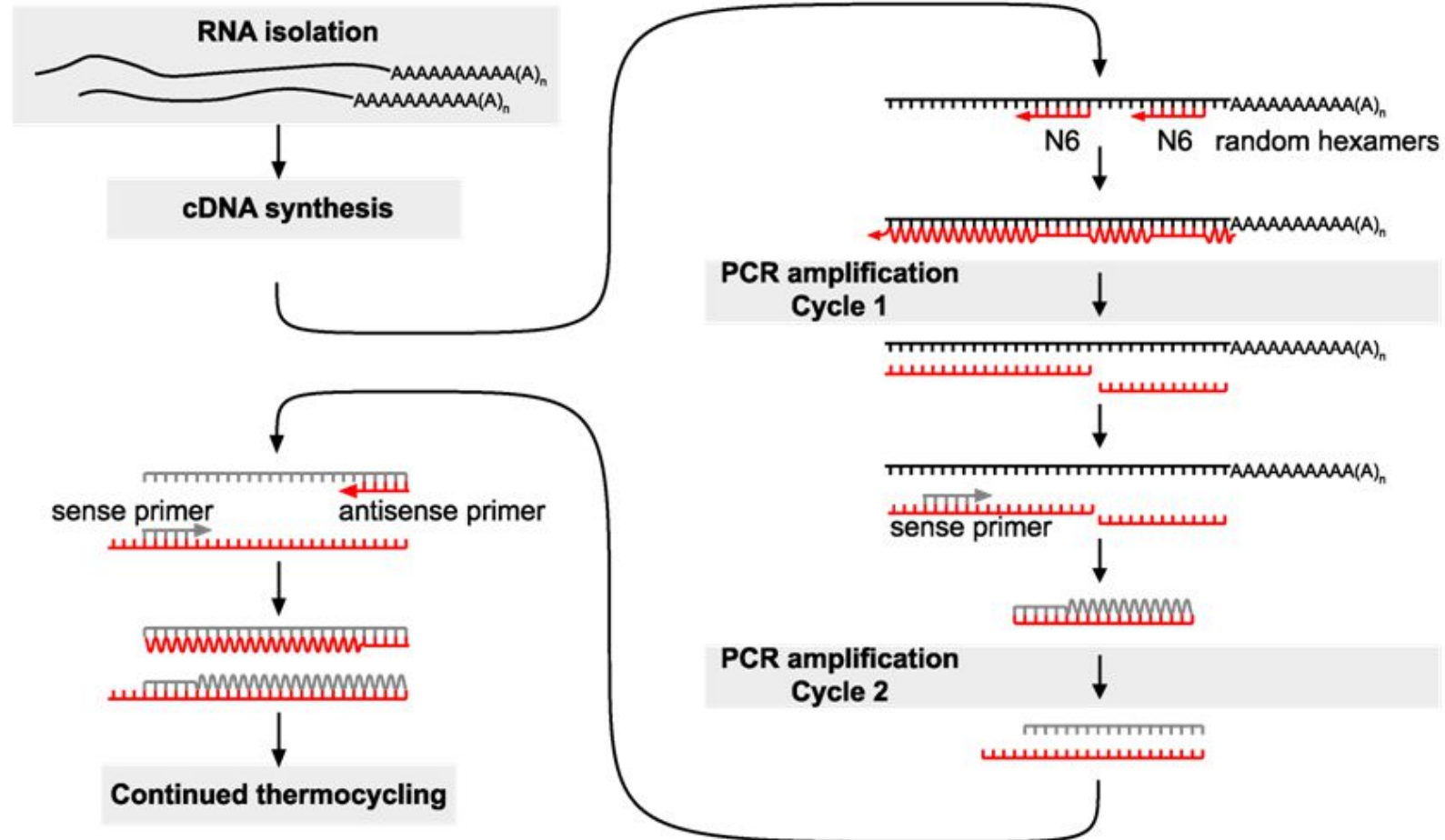
Flowchart of RT-PCR



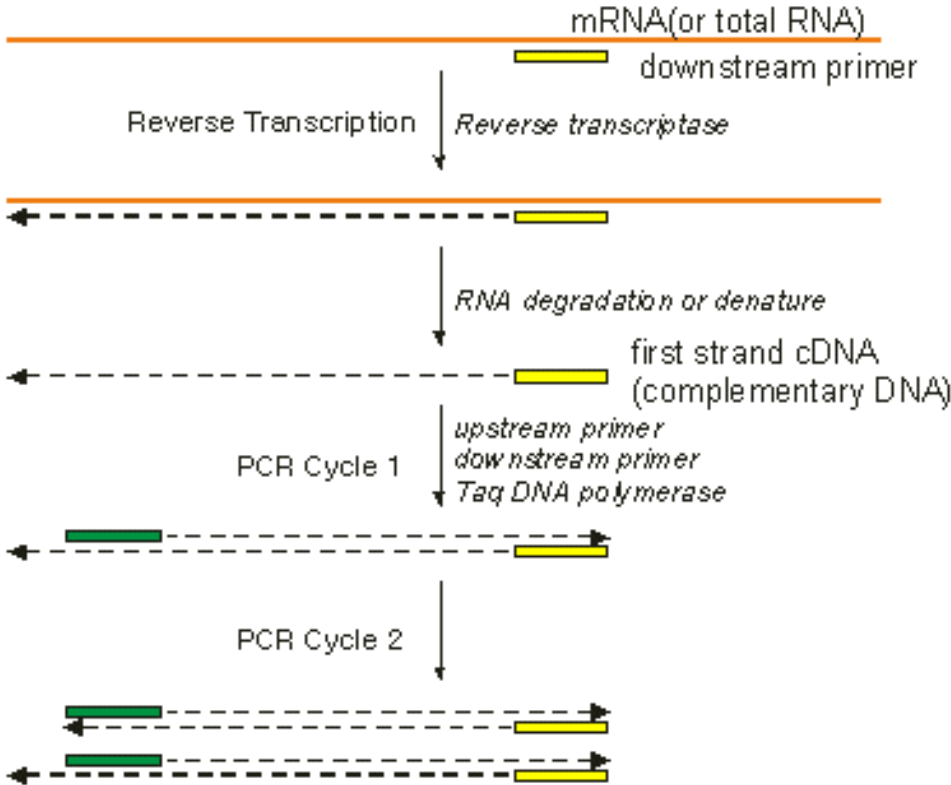
First Strand Synthesis:



RT with Random Hexamer Priming

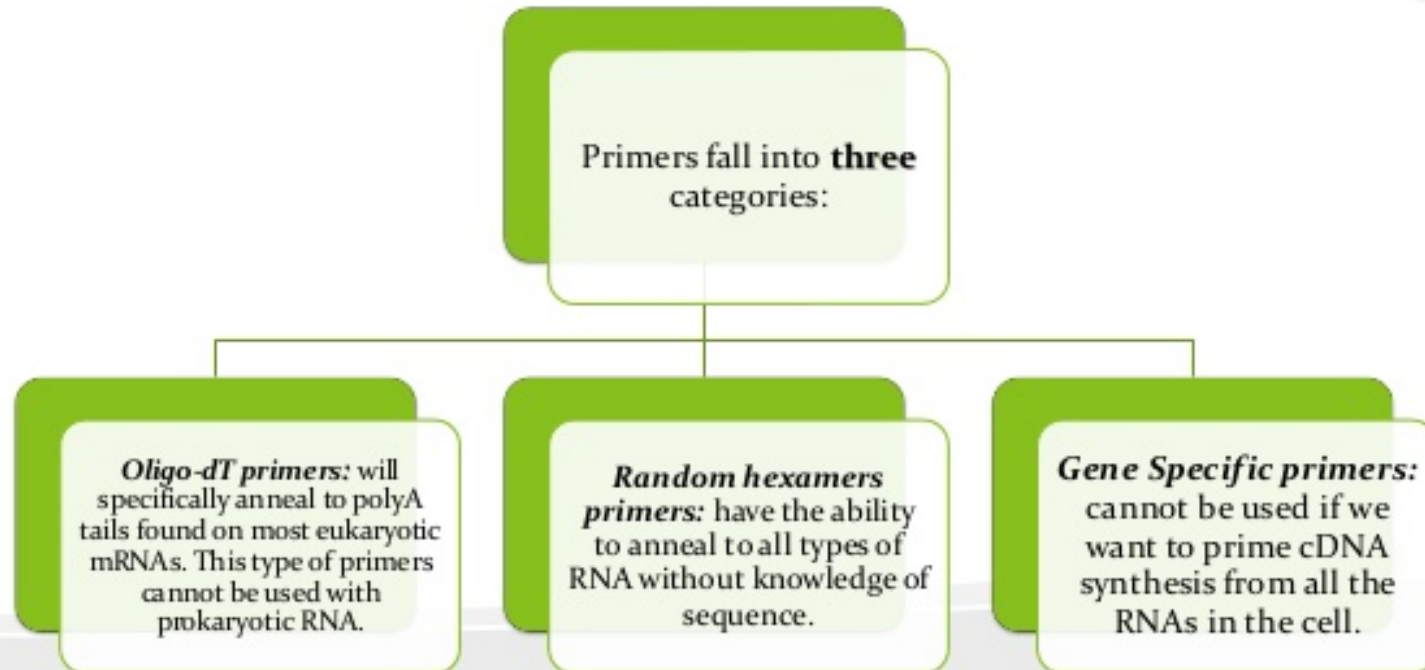


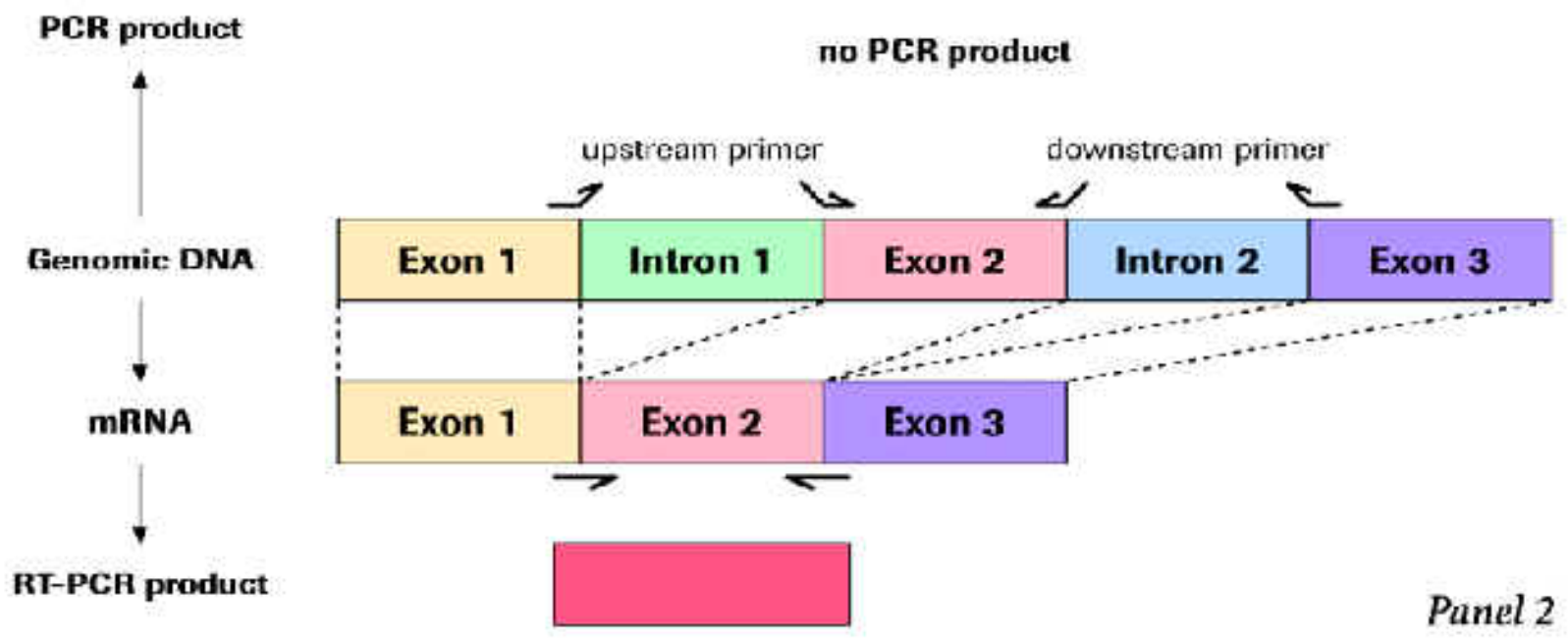
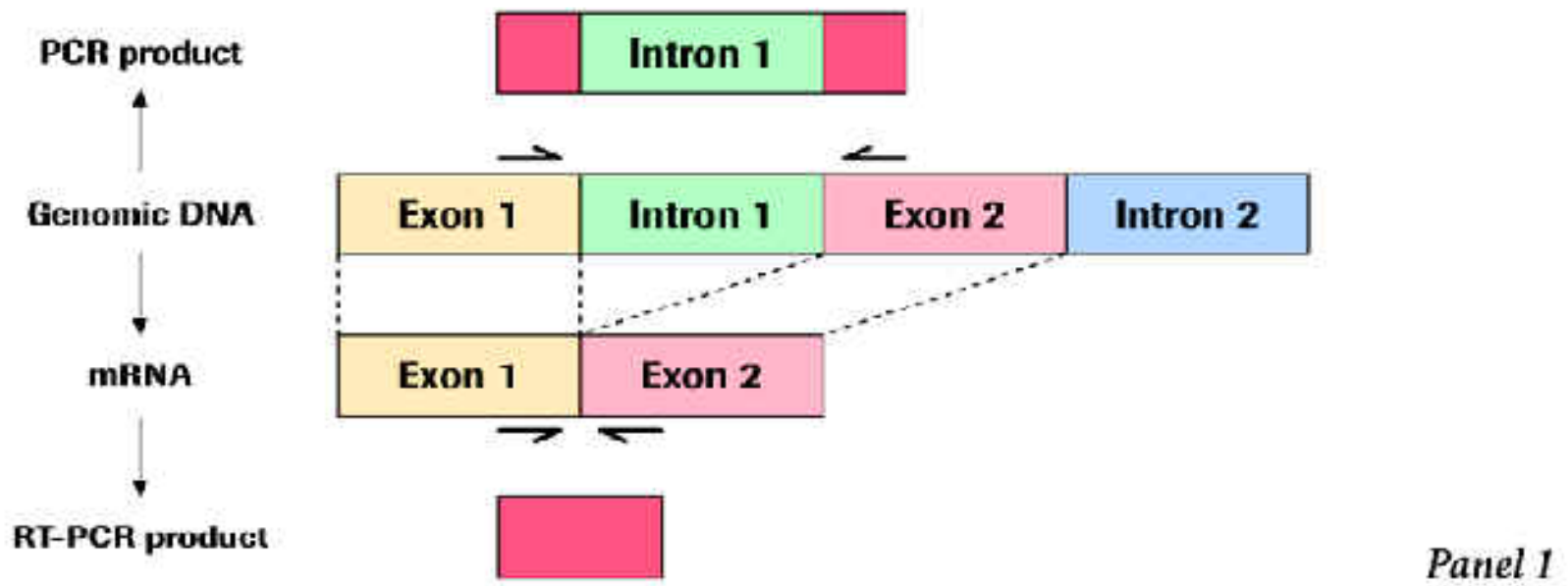
Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)





Primers Categories:

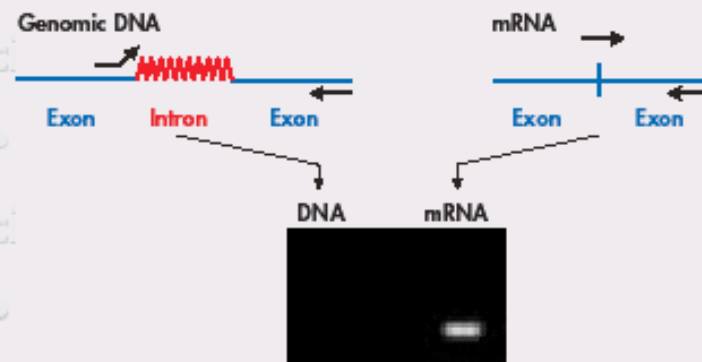




Reproducibility • Efficiency • Specificity

RT-PCR Primer Design

A



B

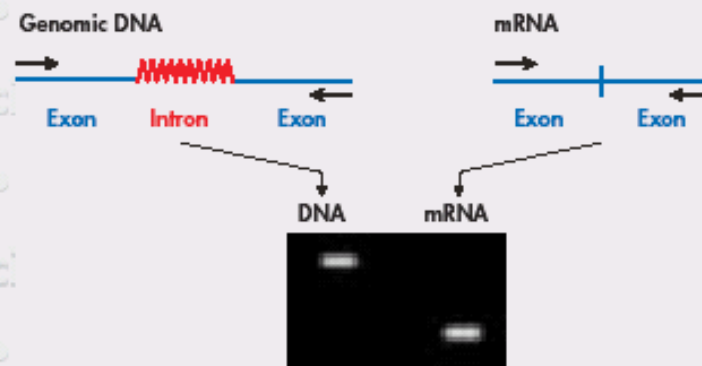


Figure 4

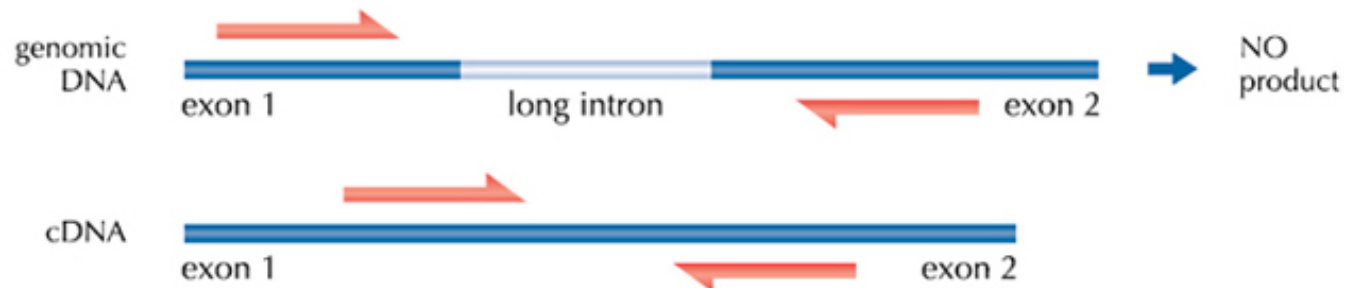
Design of RT-PCR primers to **A** eliminate or **B** detect amplification from contaminating genomic DNA.

Efficiency • Specificity • Reproducibility

1. Primer spans an exon-intron boundary:



2. Primers flank an intron:



Primer Options	Structure and Function	Advantages	Disadvantages
Oligo(dT)s (or anchored oligo(dT)s)	Stretch of thymine residues that anneal to poly(A) tail of mRNA; anchored oligo(dT)s contain one G, C, or A (the anchor) residue at the 3' end	<ul style="list-style-type: none"> • Generation of full length cDNA from poly(A)-tailed mRNA • Good to use if little starting material is available • Anchor ensures that the oligo(dT) primer binds at the 5' end of the poly(A) tail of mRNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Only amplify gene with a poly(A) tail • Truncated cDNA from priming internal poly(A) sites*2 • Bias towards 3' end* <p>*Minimized if anchored oligo(dT)s are used</p>
Random Primers	Six to nine bases long, they anneal at multiple points along RNA transcript	<ul style="list-style-type: none"> • Anneal to all RNA (tRNA, rRNA, and mRNA) • Good to use for transcripts with significant secondary structures, or if little starting material is available • High cDNA yield 	<ul style="list-style-type: none"> • cDNA is made from all RNAs which is not always desirable and can dilute mRNA signal • Truncated cDNA
Sequence Specific Primers	Custom made primers that target specific mRNA sequence	<ul style="list-style-type: none"> • Specific cDNA pool • Increased sensitivity • Use reverse qPCR primer 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthesis is limited to one gene of interest

Table 2. Primer considerations for the cDNA synthesis step of RT-qPCR. Combining random primers and anchored oligo(dT) primers improves the reverse transcription efficiency and qPCR sensitivity.

	Advantages	Disadvantages
One-step	<ul style="list-style-type: none"> • Less experimental variation since both reactions take place in the same tube • Fewer pipetting steps reduces risk of contamination • Suitable for high throughput amplification/screening • Fast and highly reproducible 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossible to optimize the two reactions separately • Less sensitive than two-step because the reaction conditions are a compromise between the two combined reactions • Detection of fewer targets per sample
Two-step	<ul style="list-style-type: none"> • A stable cDNA pool is generated that can be stored for long periods of time and used for multiple reactions • The target and reference genes can be amplified from the same cDNA pool without multiplexing • Optimized reaction buffers and reaction conditions can be used for each individual reaction • Flexible priming options 	<ul style="list-style-type: none"> • The use of several tubes and pipetting steps exposes the reaction to a greater risk of DNA contamination • Time consuming • Requires more optimization than one-step

Table 1. Advantages and Disadvantages when using one-step versus two-step assays in RT-qPCR

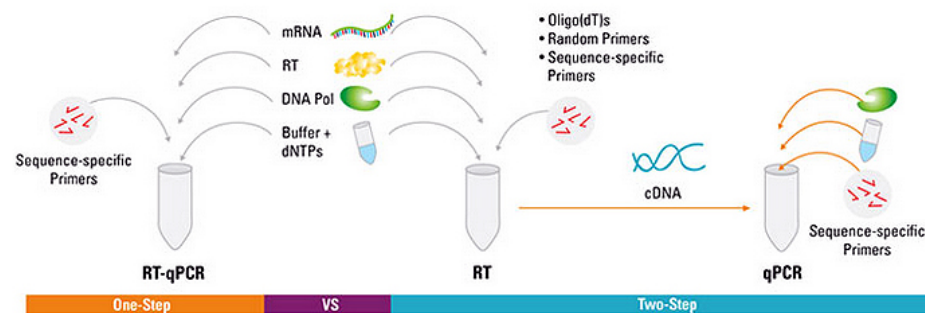


Figure 1. One-Step vs. Two-Step RT-qPCR.

la retrotrascrizione (RT)

Poiché non è possibile per molti studi usare direttamente l'mRNA, è necessario convertirlo in cDNA mediante l'utilizzo della **Trascrittasi inversa**, una DNA polimerasi RNA-dipendente.

Per RT si intende reverse transcriptase su stampo di RNA

Per avere un cDNA (DNA complementare o copia ad un RNA messaggero) si deve retrotrascrivere l'mRNA cioè farlo diventare DNA

Geni per la trascrittasi inversa sono presenti anche negli eucarioti. Li troviamo nei retrotrasposoni o nelle LINE.

L'enzima "reverse transcriptase" o trascrittasi inversa che si utilizza deriva da retrovirus eucariotici come AMV avian myeloblastosis virus e M-MuLV Moloney leukemia virus murino che lavorano a temperatura fisiologica. Più recentemente sono state isolate e clonate delle RT mutanti che resistono a temperatura più alta di 37° C (fino a 60° C consentono ibridizzazione dei primers specifici più efficiente e di denaturare le strutture dell'RNA).

La **Trascrittasi inversa** possiede due tipi di attività enzimatica:

- attività polimerasica 5'-3', a partire da un primer di DNA o RNA per iniziare la sintesi;
- attività di RNasi H.

(l'RNasi H è una ribonucleasi che degrada l'RNA negli ibridi DNA-RNA come quelli che si formano dopo la trascrizione inversa di uno stampo ad RNA.

La Trascrittasi inversa manca di attività proof-reading (3'-5' esonucleasica).

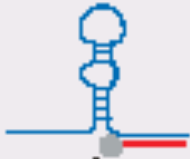


Le **Trascrittasi inverse** più utilizzate sono:

- MMLV-RT ottenuta dal virus della leucemia murina di Moloney. È un singolo polipeptide di 71 KDa.
- AMV-RT ottenuta dal virus della mieloblastosi aviaria. È costituita da due subunità di 64 e 96 KDa.

L' MMLV-RT mostra una più debole attività RNasi H rispetto all' AMV-RT, quindi è più vantaggiosa quando è utilizzata nella sintesi del cDNA da lunghe molecole di mRNA.

Importanza delle strutture dell'mRNA per l'efficienza di retrotrascrizione

Table 1.

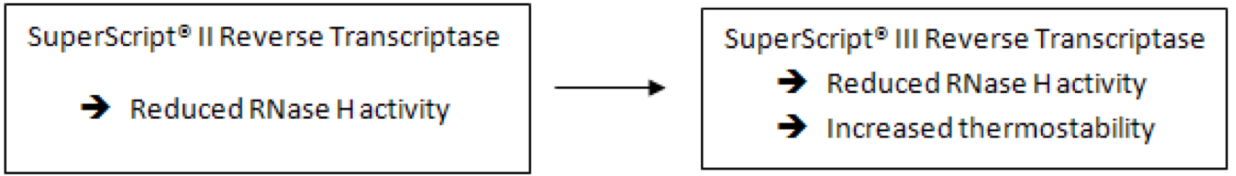
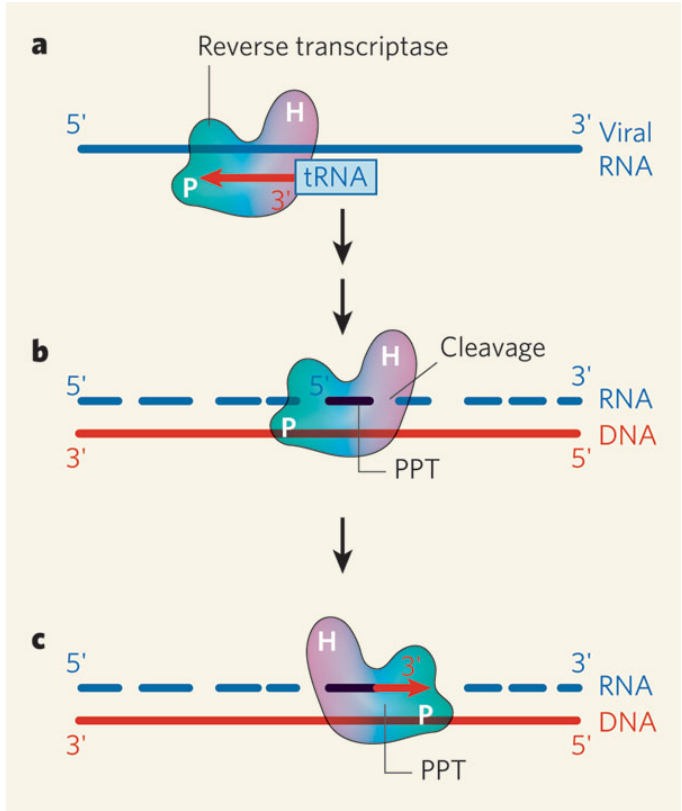
Cause	Effect on cDNA	RT-PCR result
A RT stops or dissociates at RNA region with complex secondary structure	 <p data-bbox="898 767 1272 810">Truncated cDNA products</p>	cDNA products missing primer-binding site not amplified
B RT skips RNA region with complex secondary structure	 <p data-bbox="898 1023 1272 1098">Shortened cDNA products with internal deletions</p>	Shortened PCR products with internal deletions
C RT reads through	 <p data-bbox="936 1257 1272 1294">Full-length cDNA products</p>	Full-length RT-PCR products

Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) is an RNA-dependent DNA polymerase that can be used in cDNA synthesis with long messenger RNA templates (>5kb). The enzyme is a product of the *pol* gene of M-MLV and consists of a single subunit with a molecular weight of 71kDa. The RNase H activity of M-MLV RT is weaker than the commonly used Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase.

Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV RT) catalyzes the polymerization of DNA using template DNA, RNA or RNA:DNA hybrids. It requires a primer (DNA primers are more efficient than RNA primers) as well as Mg^{2+} or Mn^{2+} . The enzyme possesses an intrinsic RNase H activity. Both nonionic detergents and sulfhydryl compounds stabilize the enzyme activity in vitro.

Controls for RT-qPCR

A minus Reverse Transcription control (-RT control) should be included in all RT-qPCR experiments to test for contaminating DNA (such as genomic DNA or PCR product from a previous run). Such a control contains all the reaction components except for the reverse transcriptase. Reverse transcription should not occur in this control, so if PCR amplification is seen, it is most likely derived from contaminating DNA.



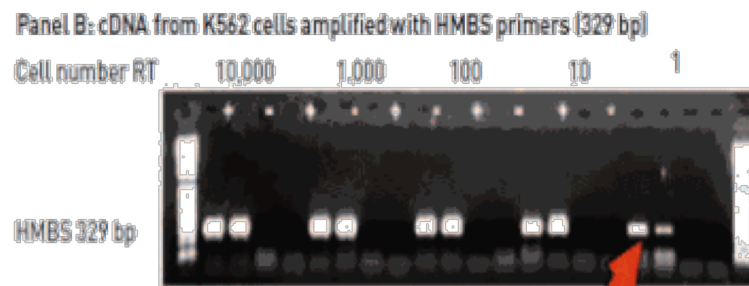
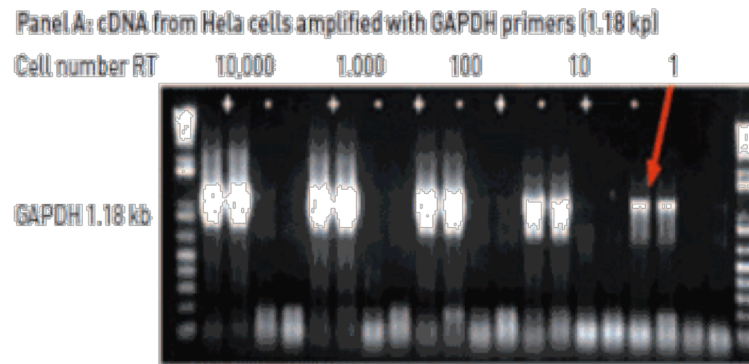
SuperScript® III Reverse Transcriptase (RT) is engineered for higher thermostability, with a longer half-life at 50°C, and reduced RNase H activity, resulting in higher yields of full-length cDNA for more complete gene product representation.

If you need cDNA that represents input RNA with maximum fidelity and highest sensitivity for real time RT-PCR, you need SuperScript® III RT.

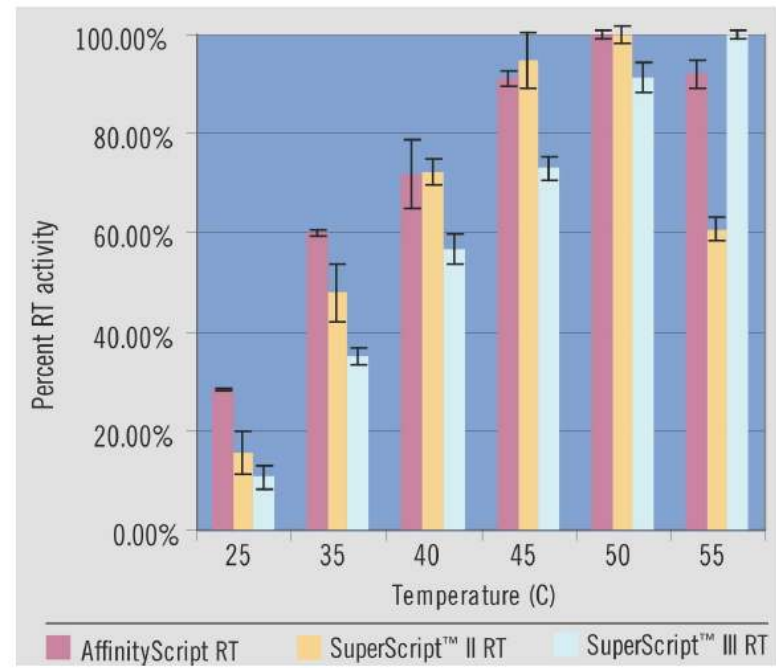
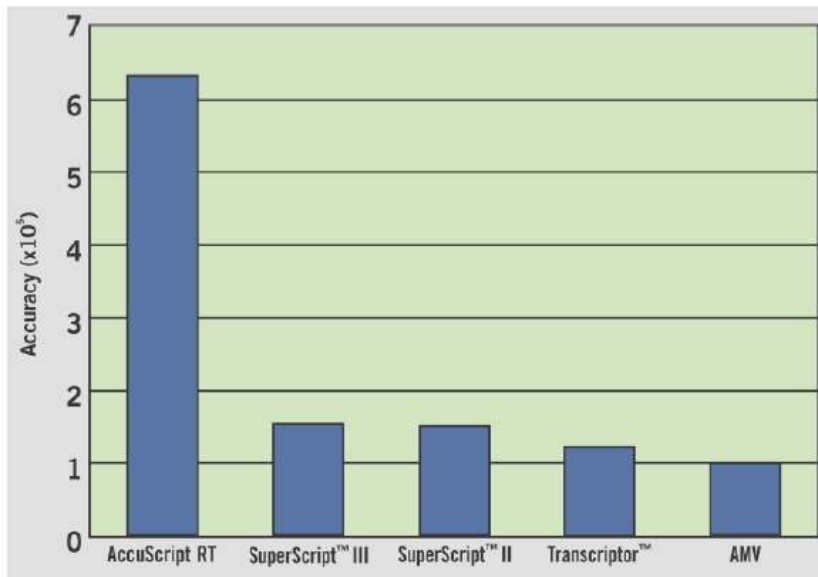
RNA transcripts exhibit significant secondary structure that must be denatured for efficient reverse transcription. At higher temperatures, RNA is less structured, but common reverse transcriptases (e.g., MuLV and AMV) are also inactive at temperatures greater than 45°C.

SuperScript® III RT has been engineered for high thermostability and has a half-life of 220 minutes at 50°C. This increases its ability to process RNA with secondary structures

The ideal reverse transcriptase will reverse transcribe even the least abundant mRNA within a pool, allowing single-cell transcript detection. The high sensitivity of SuperScript® III RT is demonstrated with targets of varying sizes



Single Cell Detection



Forensic Sciences: DNA testing



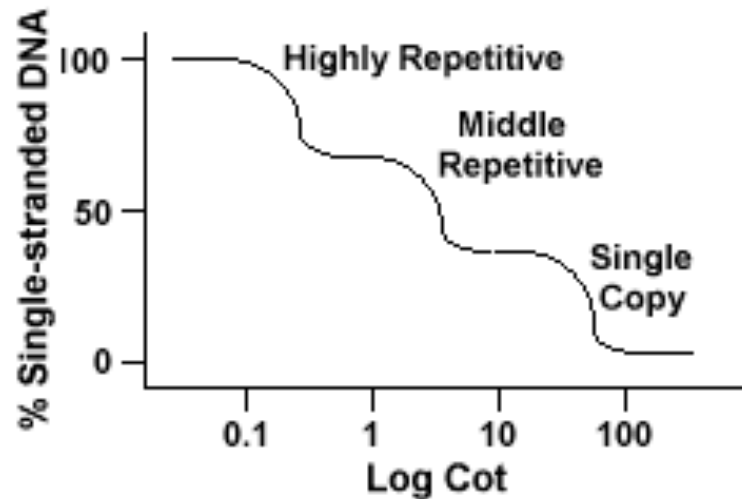
What are some of the DNA technologies used in forensic investigations?

- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
- PCR Analysis
- STR Analysis
- Mitochondrial DNA Analysis
- Y-Chromosome Analysis

Repetitive DNA in the Human Genome

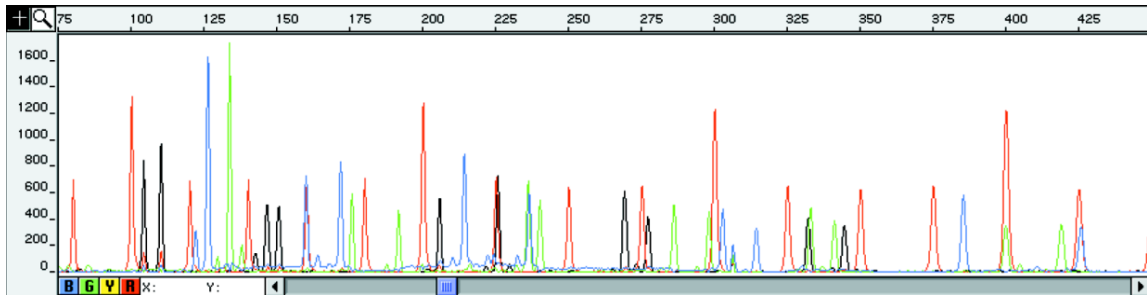


- Less than 2% codes for Proteins
- 50% of the genome contains repeated sequences
 - No apparent function
 - Recombination?
 - Formation of new genes?



- Types of repeated DNA
 - Tandomly repeated
 - Telomeres
 - Satellite (VNTRs)
 - Minisatellite (STRs)
 - Interspersed repetitive DNA
 - SINES (Alu sequences)
 - LINES
 - Transposable elements

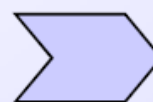
Are you just a number?



Camp Randall

Il profilo genetico

L'analisi dei microsatelliti di una persona consente di tracciare una sorta di codice a barre del DNA: il **PROFILO GENETICO**.



Il profilo genetico è una caratteristica che accompagna ogni individuo dall'epoca del concepimento a dopo la morte...

Sources of Biological Evidence

- Blood
- Semen
- Saliva
- Urine
- Hair
- Teeth
- Bone
- Tissue



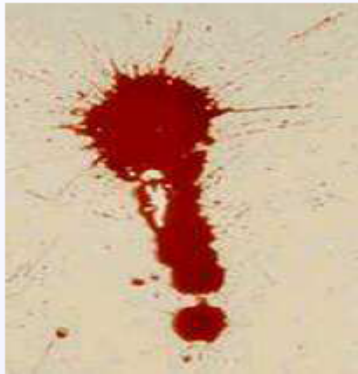
Come si traccia un profilo genetico?

1. **Estrazione del DNA dal campione**
2. PCR (Polymerase Chain Reaction)
3. Sistema capillare con elettroferogrammi a “picchi”
4. Confronto tra i diversi profili genetici ottenuti
5. Analisi probabilistica

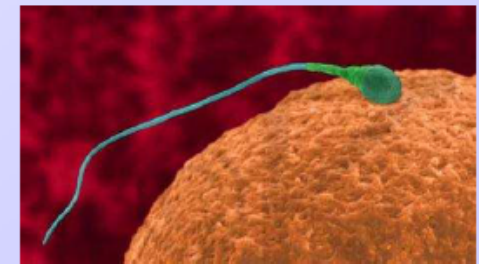


Estrazione del DNA dal campione

Tutte le cellule di una persona, da una cellula del sangue a una della pelle, da una cellula dell'osso a una di un capello, **HANNO LO STESSO, IDENTICO DNA.**



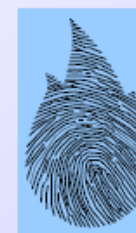
Si può trovare il DNA
praticamente in tutti i materiali
biologici



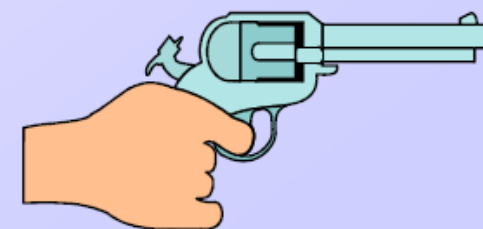
Associazione Identificazioni Forensi (A.I.Fo.)

Altri oggetti potenziali fonti di DNA

DNA per contatto = da poche a 50 cellule



- Impronte digitali;
- colletti di camicie, maglie, indumenti in genere;
- passamontagna, caschi da moto;
- orologi, anelli, stanghette di occhiali;
- oggetti impugnati, matite, penne, armi bianche, armi da fuoco ecc.



VNTR – variable number tandem repeats

- Location in a genome where a short nucleotide is organized as a tandem repeat
- These can be found on many chromosomes and often show variations in length
- Each variant acts as an inherited allele allowing used for identification
- Useful in genetics, biology research, forensics and DNA fingerprinting

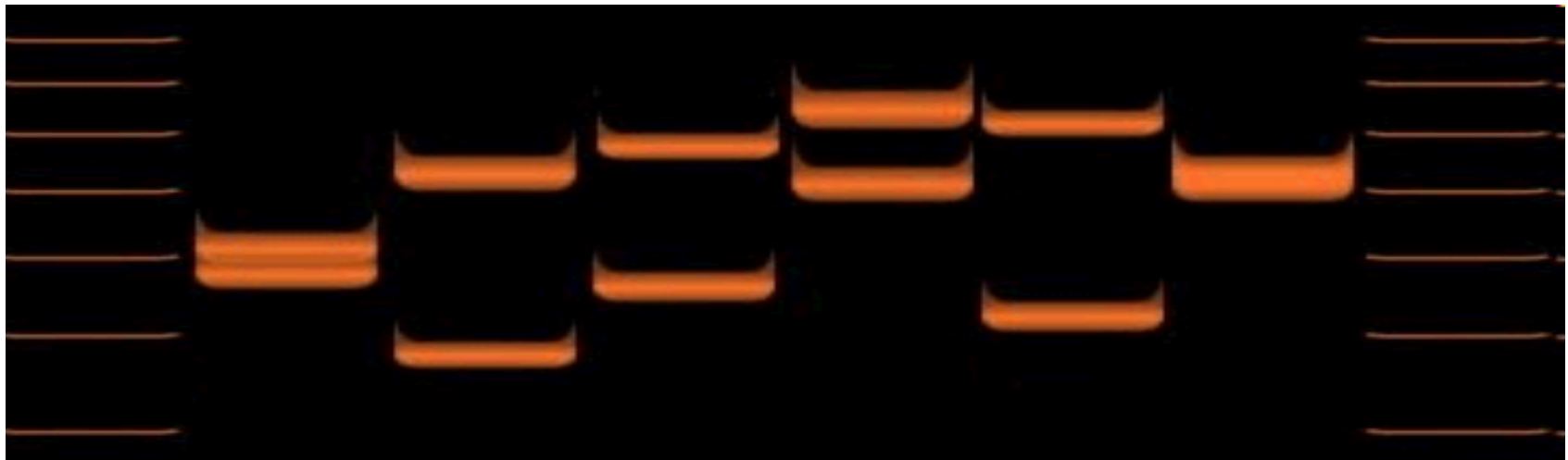


- Rectangle blocks represent repeated DNA sequences at a particular VNTR location
- Repeats are tandem – clustered together and oriented in same direction
- Repeats can be removed or added leading to alleles with different numbers of repeats.

The likelihood of 2 unrelated individuals having same allelic pattern extremely improbable.

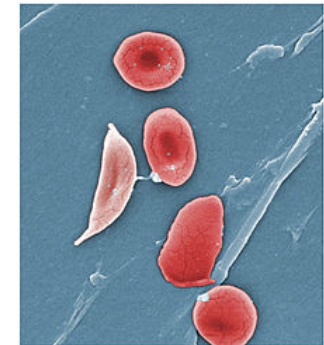
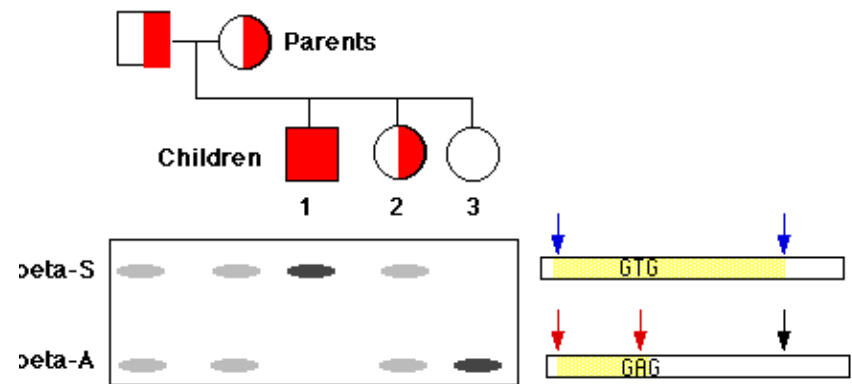
VNTR

- VNTR blocks can be extracted with restriction enzymes and analyzed by RFLP or amplified by PCR and size determined by electrophoresis
- The picture below illustrates VNTR allelic length variation among 6 individuals.



VNTR

- The following diagram illustrates how VNTR analysis can be used to diagnose sickle cell anemia in a family.
- Parents are carriers (heterozygotes)
- Refer to <http://tinyurl.com/c9xxr2> for the case study.



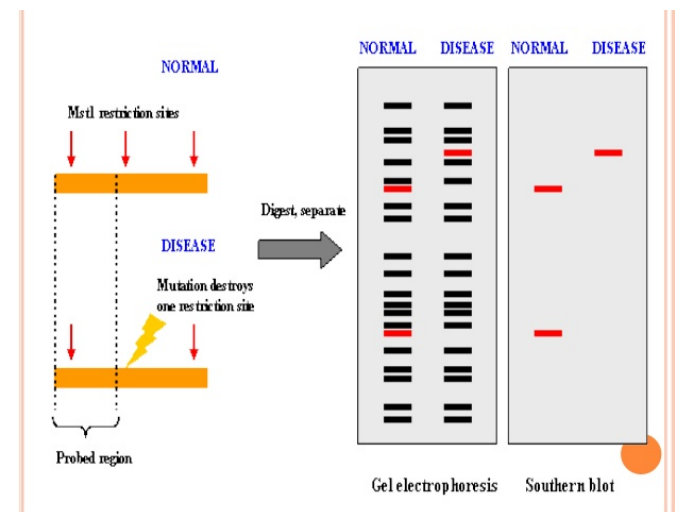
- Prenatal diagnosis in twin pregnancy: Identification of each twin, confirmation of parentage and elimination of maternal contamination of chorionic villus samples were ruled out by variable number of tandem repeats (VNTR) analysis of four different loci [D1S80 (pMCT118), ApoB, IgJH, D4S95]

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism and Forensics

- Analyzes variable lengths of DNA fragments
- One of the original applications of DNA analysis
- **Not used as much anymore because it requires a large quantity of DNA sample and samples degraded by the environment do not work well with RFLP**

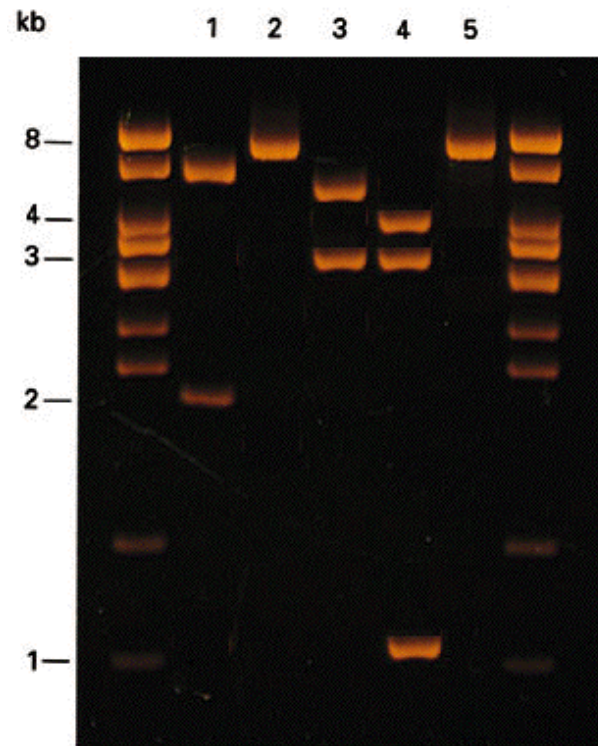
RFLP – restriction fragment length polymorphism

- Variation in the DNA sequence of a genome detected by breaking DNA into pieces with restriction enzymes.
- Analyze fragment by gel electrophoresis
- Important tool in genome mapping, localization of genetic disease genes, determination of risk for a disease, genetic fingerprinting and paternity testing



RFLP - Applications

- Agriculture – direct method for selecting desirable genes such as disease resistance
- Genetic mapping
 - Determine disease status of an individual, ie, Huntington's chorea
 - Cystic fibrosis
 - Sickle cell anemia
- Genetic counseling – very important when discussing results with patients or parents who use this technology to have children who are free of genetic disease.

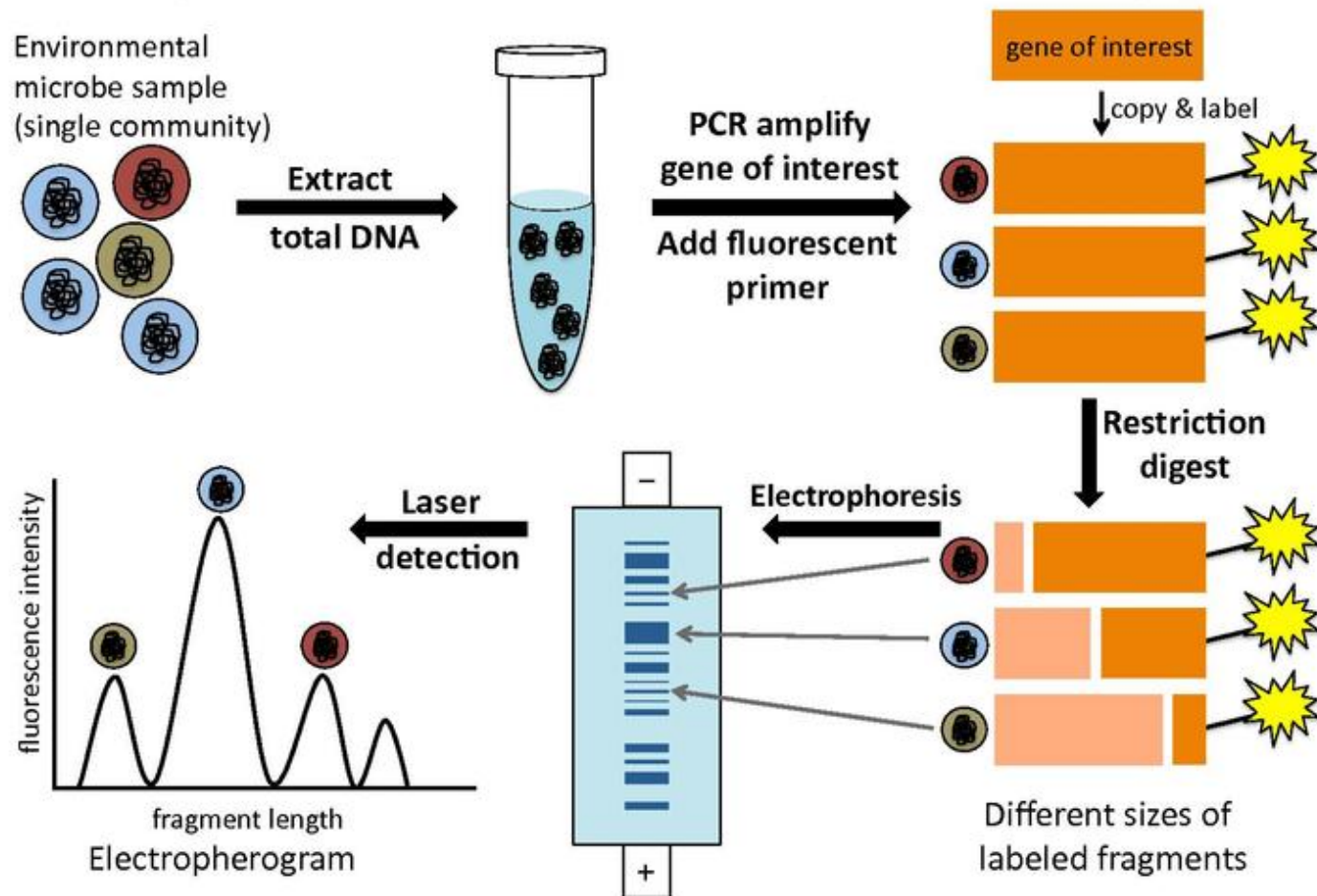


RFLP variation in DNA

Lanes 2 & 5 show the typical pattern
 Lanes 1 & 3 have one extra restriction site each
 Lane 4 shows a variant of Lane 3,
 with one extra restriction site



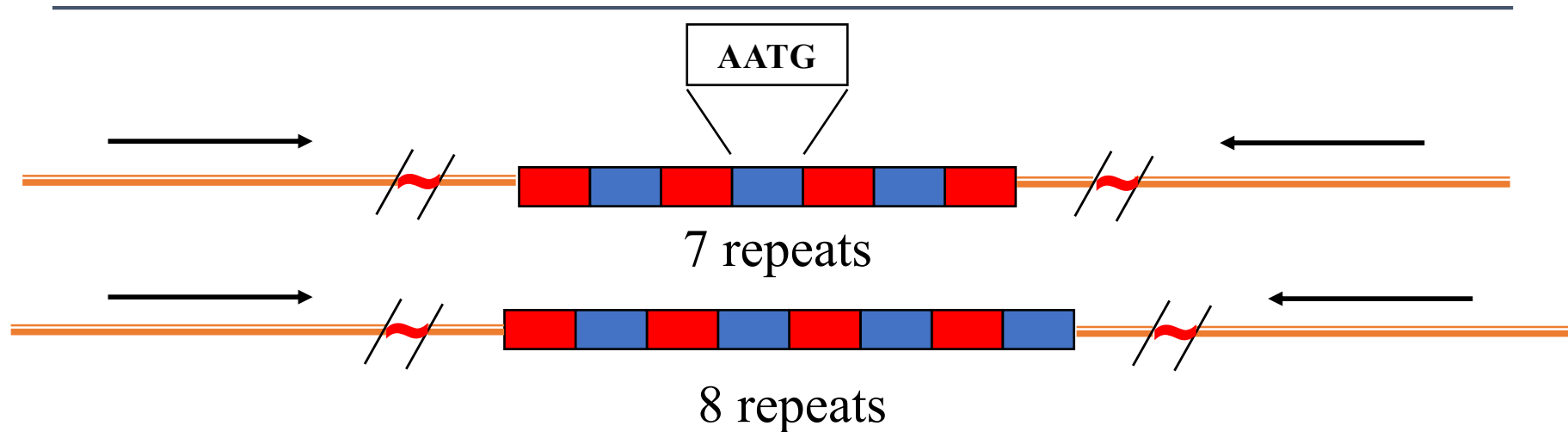
T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism



What are STRs?

- **Short Tandem Repeats (STR)** are repetitive sequences:
 - Tetranucleotide: AAAG AAAG AAAG AAAG
 - Trinucleotide: CTT CTT CTT CTT CTT
 - Dinucleotide: AG AG AG AG AG AG
- **Tetranucleotides** are favored in human identity
 - Good balance of “ease of interpretation” and “variability found in nature”

Short Tandem Repeats (STRs)



- Repeat region is variable (**polymorphic**)
 - Each variant is referred to as an **allele**
- Flanking region is constant

KEY: Alleles are distinguished by length

Homozygote = both alleles are the same length

Heterozygote = alleles differ and can be resolved from one another

STR – short tandem repeat in DNA

- Occurs when a pattern of TWO or more nucleotides are repeated and the repeated sequences are adjacent to each other.
- Pattern can range in length from 2 to 10 bp
- Typically in non-coding intron region
- Count how many repeats of a specific STR at a given locus can create unique genetic profile
- Currently over 10,000 published STR sequences in human genome
- Prevalent method for determining genetic profiles in forensic cases.

I polimorfismi nelle indagini forensi

I polimorfismi utilizzati oggi nelle indagini genetico-forensi sono i **MICROSATELLITI** o **STR (Short Tandem Repeats)**.

Un microsatellite è una specifica zona del DNA non-codificante costituita dalla ripetizione in successione (un numero variabile di volte) di un “blocco” costituito da 4 basi azotate.

La differenza tra un allele e l'altro sta nella lunghezza, determinata dal numero di ripetizioni.

MICROSATELLITE

Unità di ripetizione: **GACT**:

Allele 3: AT **GACT GACT GACT** TTCG (3 ripetizioni)

Allele 4: AT **GACT GACT GACT GACT** TTCG (4 ripetizioni)

Allele 5: AT **GACT GACT GACT GACT GACT** TTCG (5 ripetizioni)

Allele 6: AT **GACT GACT GACT GACT GACT GACT** TTCG (6 ripetizioni)

Allele 7: AT **GACT GACT GACT GACT GACT GACT GACT** TTCG (7 ripetizioni)

STR – Applications

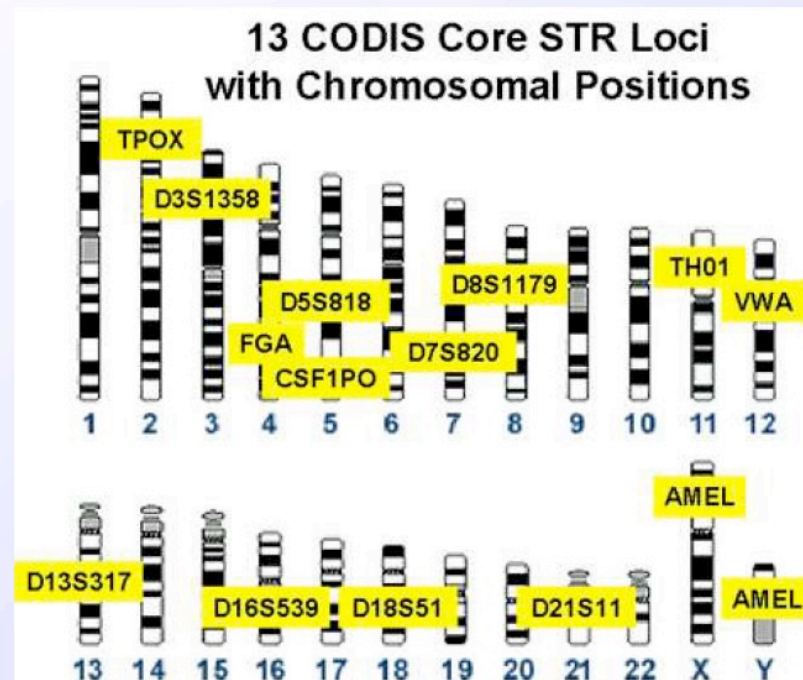
- Forensics
 - The Federal Bureau of Investigation (FBI) has chosen 13 specific STR loci to serve as the standard for CODIS.
 - Mass disasters
 - Paternity testing
 - Military DNA “dog tag” (blood sample of a bio-bank compared with body’s fragments)
 - Convicted felon DNA databases
- Bone marrow transplant follow up
 - Important for establishing graft rejection and disease relapse
 - The ratio of allele peak heights between donor and recipient good indication of success

STR: Short Tandem Repeat

- Evaluates specific regions (loci) within nuclear DNA
- FBI uses 13 standard specific STR regions for CODIS

I microsatelliti dell'FBI

Attualmente vengono utilizzati 13-15 microsatelliti (i **microsatelliti autosomici**) più un microsatellite per la diagnosi di genere.



PERCHE' IN CRIMINALISTICA 13 MARCATORI AUTOSOMICI SONO RITENUTI SUFFICIENTI PER L'IDENTIFICAZIONE?

	D8	D21	D7	CSF	D3	TH01	D13	D16	vWA	TPO	D18	D5	FGA
Cam	13, 14	29, 30	10, 11	11, 12	15, 16	6, 7	11, 12	11, 12	16, 17	8, 8	12, 14	11, 12	21, 22
Freq	13%	11%	12%	20%	13%	13%	18%	17%	12%	28%	5%	22%	6%

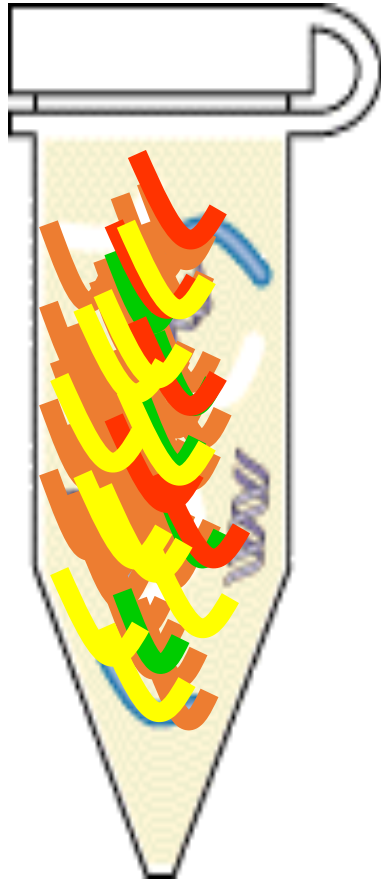
Frequenza del profilo stimata in una popolazione italiana

1 su 200.000.000.000



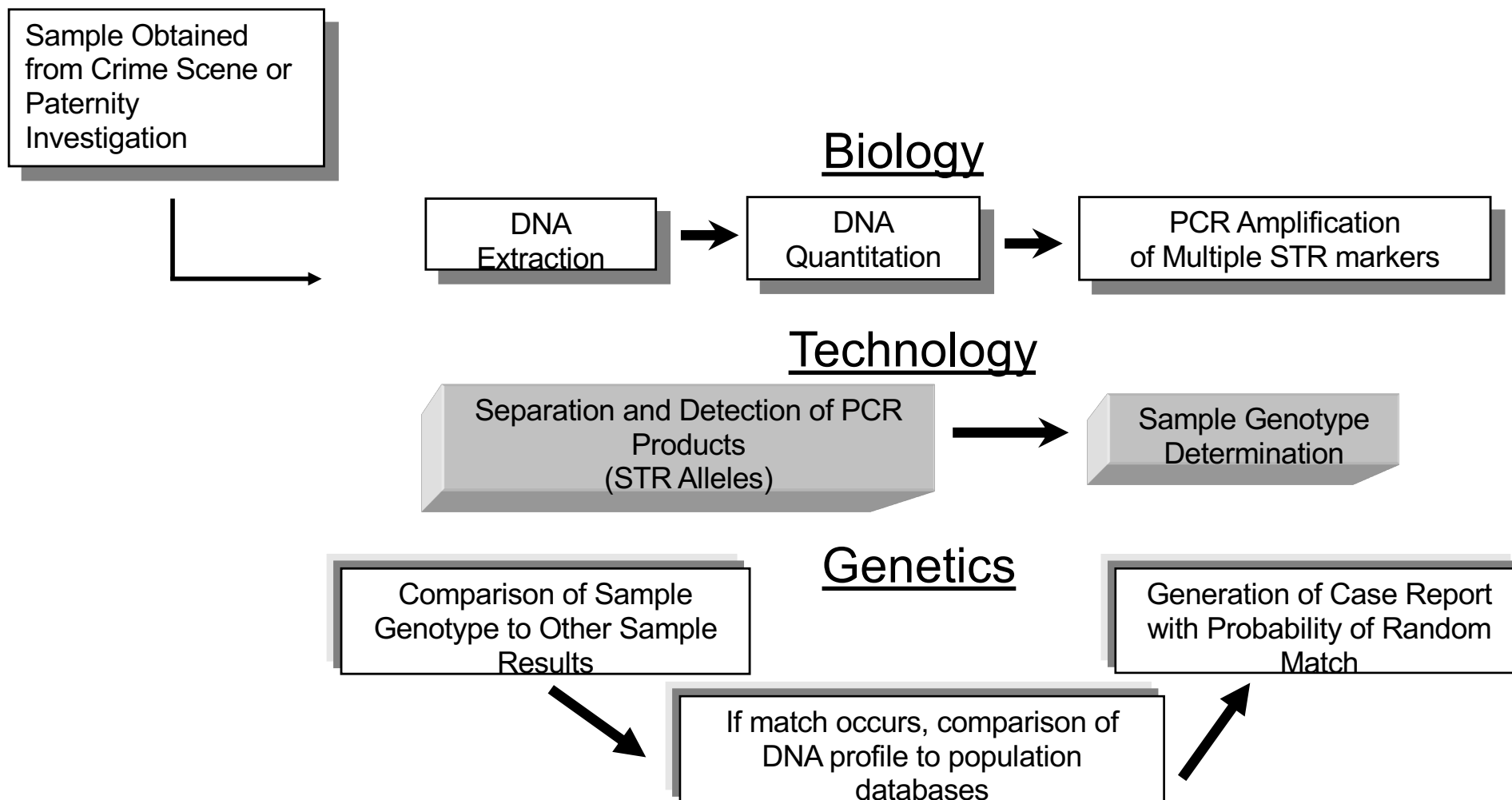
In 2001, after the attacks on the World Trade Center, DNA forensics was used to identify the missing victims of the bombings. Forensics team combed through the rubble to find any piece of remaining evidence to link the dead to their family members. Dental, blood, and hair samples were collected from ground zero, and compared to the DNA samples provided by family members in the form of hair brushes, tooth brushes, and other items that may have contained traces of biological tissue which DNA could have been extracted out of.

Multiplex PCR



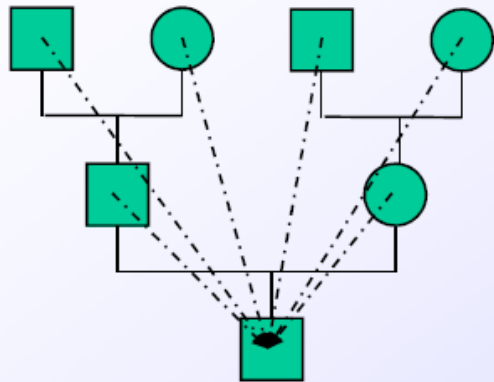
- 16 Loci Are Copied at Once
- Sensitivities to levels less than 0.5 ng of DNA
- Ability to Handle Mixtures and Degraded Samples
- Different Fluorescent Dyes Used to Distinguish STR Alleles with Overlapping Size Ranges

Steps in DNA Sample Processing



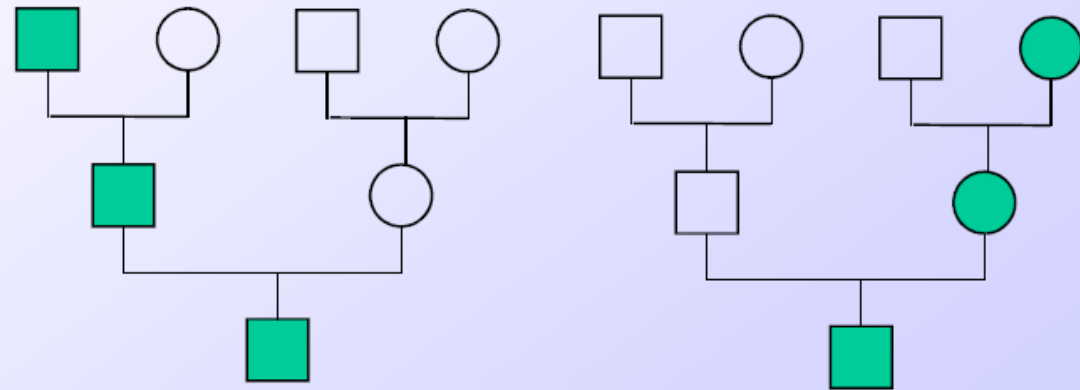
L'EREDITARIETA'

Marcatori autosomici



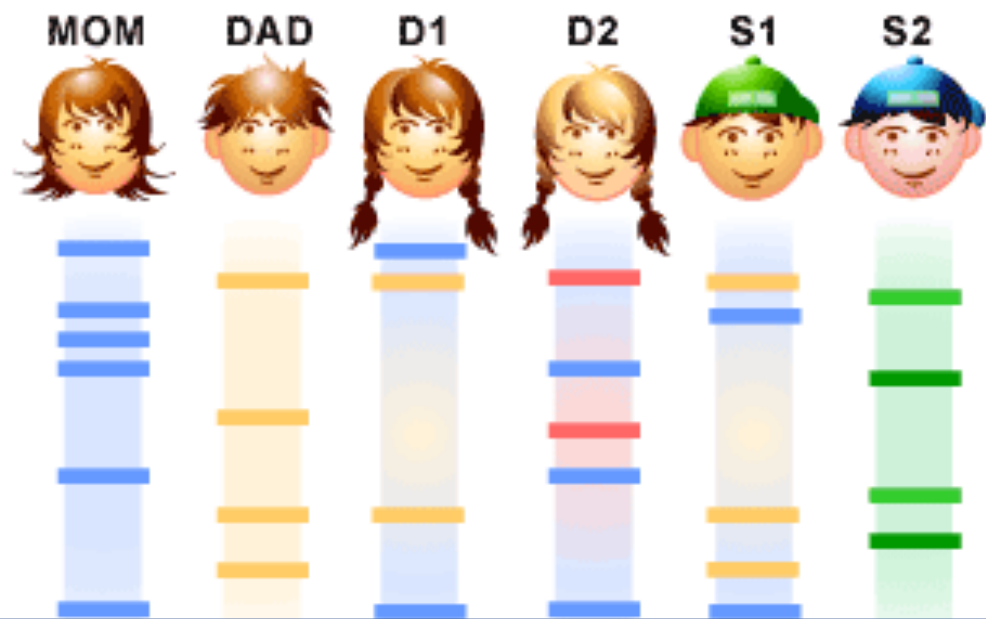
Autosomici
(trasmessi in parte da tutti
gli antenati)

Marcatori parentali

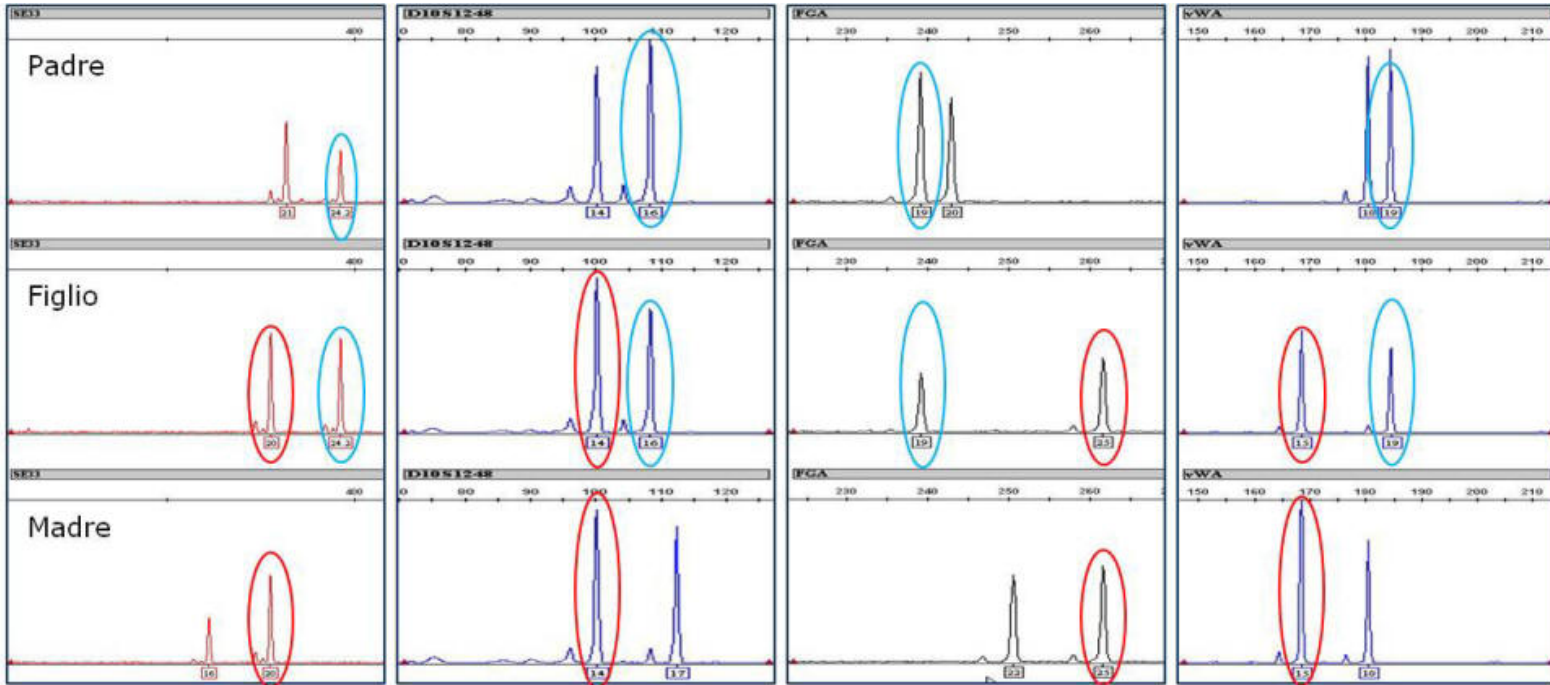


Cromosoma Y
(trasmesso intero,
ma solo tra maschi)

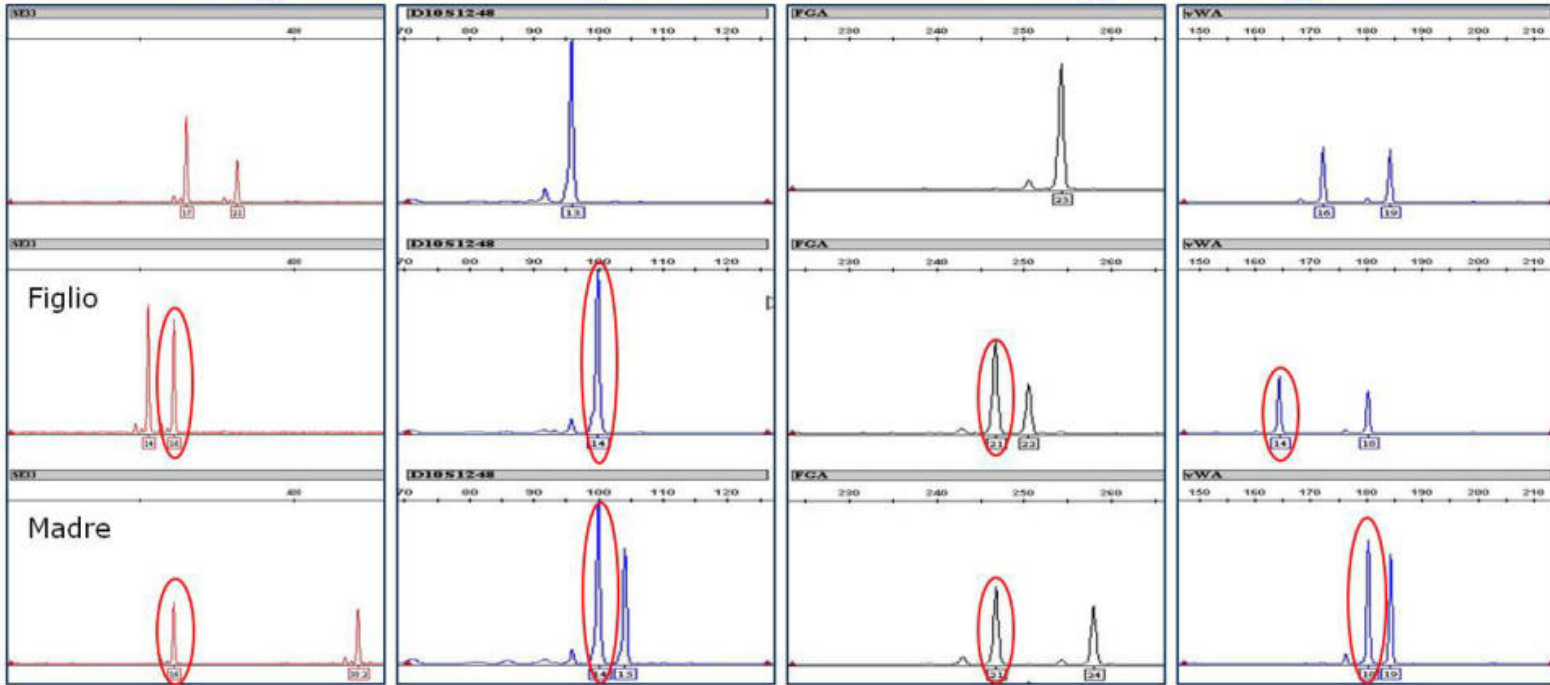
DNA mitocondriale
(trasmesso intero,
ma solo dalle femmine)



RICONOSCIMENTO



DISCONOSCIMENTO



I limiti del test del DNA

Gemelli identici non possono essere distinti con il DNA.

Campioni degradati e/o contaminati, tracce miste possono non essere interpretabili.

Il test del DNA è quasi sempre un esame comparativo.

Fratelli gemelli litigano per la paternita'

martedì, maggio 22, 2007

In America da 4 anni è in corso una **battaglia giudiziaria veramente insolita**: 2 fratelli gemelli monozigoti, Raymon and Richard Miller, si stanno contendendo la **non-paternità** di un bambino.

Entrambi gli uomini avevano in corso una relazione con la signora Holly Marie Adams, ed tutti e due avevano avuto un rapporto sessuale con lei a distanza di poche ore l'uno dall'altro, quando **la signora scoprì di essere incinta**.

Dopo nove mesi, la Adams dichiarò Raymon essere il padre, ma quest'ultimo **contestò la decisione** chiamando in causa suo fratello. Fu deciso quindi di fare un **test del DNA**, che ovviamente dette lo stesso risultato per entrambi: **99,9% di probabilità di essere il vero padre** del bambino.

Risultato? Nessuno dei due fratelli vuole pagare gli alimenti, ma la corte ha deciso che in caso di parità del test del DNA, Raymon, in quanto "nominato" dalla signora, rimarrà il padre.

Raymon ha quindi deciso di appellarsi alla corte federale per far valere le proprie ragioni.

