

Manual de laboratori per a Tècniques en Anàlisi Criminal

Grau en Criminologia
Doble grau en Dret-Criminologia
Curs 2013-2014

Departament de Genètica
Universitat de València

Objectiu de les pràctiques

Aquestes sessions pràctiques pretenen familiaritzar l'estudiant amb algunes de les tècniques bioquímiques i genètiques que permeten detectar la variabilitat en les poblacions humanes i la seva possible aplicació en la identificació de persones.

Les pràctiques es desenvoluparan durant quatre sessions de laboratori de tres hores i mitja de durada cadascuna. En elles es pretén que els estudiants, a partir d'una sèrie d'evidències experimentals, siguin capaços de determinar la identitat d'una de les mostres problema que serà presa a l'atzar d'entre els estudiants assistents a les pràctiques. Per a la identificació genètica d'un individu, es determinarà per a cada estudiant el grup sanguini, la presència o absència del cromosoma Y, així com el genotip per a un polimorfisme VNTR (Nombre Variable de Repeticions en Tàndem). La informació recollida en les diferents proves serà utilitzada per a l'assignació de la identitat.

Continguts pràctics:

1. Familiaritzar-se amb un laboratori de biologia molecular

2. Perfil genètic humà, mitjançant:

- **Determinació del grup sanguini ABO**
- **Identificació dels cromosomes sexuals X i Y mitjançant marcadors d'ADN**
- **Identificació de variants polimòrfiques per al *locus* VNTR-DRD4**

SESSIÓ 1: Familiarització amb un laboratori de biologia molecular

Activitats

- Plantejament i organització de les sessions
- Normes de seguretat i higiene
- Equipament bàsic al laboratori
- Maneig de micropipetes
- Separació de fragments d'ADN

Durant aquesta sessió l'alumne es familiaritzarà amb el funcionament i ús dels equips i tècniques que s'empraran per al desenvolupament de les següents sessions. Al mateix temps se li plantejarà el contingut i la dinàmica de les següents sessions.

PLANTEJAMENT I ORGANITACIÓ DE LES SESSIONS

Com s'ha comentat prèviament, en aquestes pràctiques es pretén que els estudiants, a partir d'una sèrie d'evidències experimentals, siguin capaços de determinar la identitat d'una de les mostres problema que serà presa a l'atzar entre els estudiants assistents a les pràctiques. Per a la identificació genètica d'un individu, es determinarà en cada estudiant el grup sanguini, la presència dels cromosomes sexuals X i Y així com el genotip per a un polimorfisme VNTR (Nombre Variable de Repeticions en Tàndem).

Cadascuna de les determinacions es realitzarà emprant diversos protocols que es desenvoluparan al llarg de diverses sessions.

A) Identificació dels cromosomes sexuals X i Y, mitjançant marcadors d'ADN

- A.1) Extracció d'ADN genòmic humà a partir de cèl·lules epitelials de mucosa bucal (Protocol 1).
- A.2) Reacció d'amplificació d'ADN (PCR) del locus de l'amelogenina (Protocol 2).
- A.3) Visualització dels resultats mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (p / v) (Protocol 2_cont).

B) Identificació de variants polimòrfiques per al *locus* DRD4

- B.1) Reacció d'amplificació d'ADN (PCR) utilitzant encebadors específics per al *locus* VNTR DRD4 (Protocol 3). S'emprarà el DNA obtingut en el punt t o A.1).
- B.2) Visualització dels resultats mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 2% (p / v). (Protocol 3_cont).

C) Determinació del grup sanguini ABO

- C.1) Extracció de sang i reaccions d'aglutinació (Protocol 4).

Durant les 4 sessions se seguirà la següent distribució d'activitats i objectius:

Sessió	Objectius	Activitat
1	Familiarització laboratori de Biologia molecular	<ul style="list-style-type: none"> • Plantejament i organització de les sessions • Normes de seguretat i higiene • Equipament bàsic • Maneig micropipetes • Separació de fragments d'ADN
2	Perfils genètics (protocol 1)	<ul style="list-style-type: none"> • Extracció d'ADN a partir de saliva • Comprovació mitjançant gel d'agarosa
3	Perfils genètics (protocols 2 i 3) Perfils grup sanguini (protocol 4)	<ul style="list-style-type: none"> • PCR amelogenina • PCR DRD4 • Determinació grups sanguinis
4	Perfils genètics (protocols 2_cont i 3_cont)	<ul style="list-style-type: none"> • Separació fragments d'ADN en gels d'agarosa • Identificació cromosomes sexuals • Determinació polimorfisme VNTR
	Anàlisi i discussió de tots els resultats	<ul style="list-style-type: none"> • Determinar a qui correspon la mostra problema

Els resultats que s'obtinguin en les diferents proves s'aniran afegint en una taula on s'indicarà el codi de la mostra/estudiant i el seu corresponent fenotip/genotip per als diferents marcadors.

NORMES DE SEGURETAT I HIGIENE

En tot laboratori de biologia molecular cal tenir en compte les següents normes:

1. L'àrea de treball ha de romandre sempre neta i ordenada. Cada grup de pràctiques es responsabilitzarà de la seva zona de treball i del seu material. Al final de cada sessió, el material i la taula de treball ha de quedar com al principi.
2. A la zona de treball no convé deixar material d'escriptori o objectes personals innecessaris.
3. És convenient utilitzar bata de laboratori. No només per protegir-nos de possibles deterioraments de les peces de vestir i/o pell, sinó més aviat per evitar contaminacions de les mostres.
4. Està del tot prohibit fumar, menjar o beure al laboratori.
5. És convenient utilitzar guants de làtex d'un sol ús, que es tiraran en sortir del laboratori. Mai s'agafarà el telèfon ni s'ix del laboratori amb els guants posats per tornar a entrar.
6. El material de plàstic (microtubs, puntes, solucions...) està esterilitzat. La seua correcta utilització implica tancar les tapes immediatament després del seu ús, utilitzar una punta nova per a cada solució i per a cada mostra biològica (ADN, saliva, sang...).
7. Les deixalles líquides, no contaminants, poden tirar-se per la pila deixant córrer l'aigua. Els contaminants s'aboquen en recipients especials (líquids) o bidons del fem biològic (sòlids).
8. S'ha de prestar una atenció especial al BROMUR D'ETIDI ja que és un agent mutagènic poderós i d'efecte acumulatiu, utilitzat en biologia molecular. CAL EVITAR EL SEU CONTACTE AMB LA PELL. Per a la seua manipulació s'ha d'utilitzar guants. No s'ha d'eliminar com el fem convencional, ni tampoc per la pila de l'aigua, sinó en cubs d'eliminació de citostàtics.
9. Cal rentar-se les mans abans d'eixir del laboratori

EQUIPAMENT BÀSIC EN UN LABORATORI DE BIOLOGIA MOLECULAR

Durant aquesta sessió els alumnes es familiaritzaran amb els instruments bàsics a utilitzar durant les següents sessions:

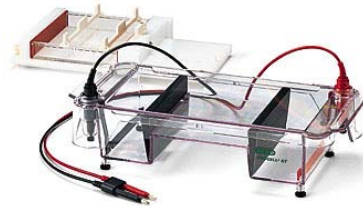
- Microcentrífuga



- Termociclador



- Sistema d'electroforesi per gels d'agarosa



- Mesclador Vortex



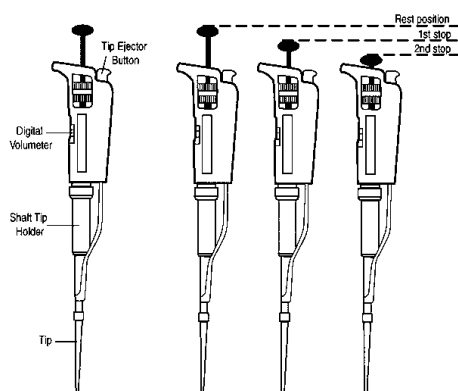
- Micropipetes per a la manipulació volums petits



- Material fungible: puntes sol ús per micropipetes: de color blanc (0,1 ml - 10 ml), groc (2 ml -200 ml) i blau (més de 200 ml); tubs de microcentrífuga de 1,5 ml, 0,5 ml i 0,2 ml.



CURA I ÚS DE LES MICROPIPETES AUTOMÀTIQUES



Parts principals d'una micropipeta.

Font: www.Fao.org

Les micropipetes automàtiques són instruments de gran precisió i el seu perfecte funcionament depèn que s'utilitzin correctament. Cada grup disposa de 3 pipetes que permeten la manipulació de volums que oscil·len entre 1 i 1.000 μ l (1 ml). La pipeta p20 s'empra per volums entre 1 i 20 μ l, la P200 per volums entre 20 i 200 μ l i la P1000 per volums entre 200 i 1.000 μ l. Tanmateix, aquest rang de volums pot variar en funció dels models i fabricants. El procés de pipetejar es pot resumir en els següents punts:

1. Triar la pipeta adequada segons el volum de líquid a prendre. Ex: per a 15 μ l prendre la p20, per a 80 μ l prendre la P200, etc.
2. Ajustar acuradament el volum a prendre, sense cometre errors de lectura en l'escala graduada de cada tipus de pipeta.
3. Empènyer amb suavitat l'embol fins al final del seu recorregut (primer límit, *1st stop* en l'esquema). Amb la pipeta, prendre una punta de la capsula de puntes sense tocar-la amb la mà.
4. Amb la pipeta en posició vertical, introduir l'extrem de la punta en la solució corresponent. En tornar amb suavitat l'embol al seu origen s'arrossegarà a l'interior de la punta el volum desitjat. El brusco retorn de l'embol pot arrossegar líquid a l'interior de la pipeta, cosa que pot fer malbé el seu delicat mecanisme.
 - a. Tenir en compte els dos límits del recorregut de l'embol. El primer límit (ofereix lleugera resistència al dit) indica el volum exacte a prendre. El segon límit (recorregut extra; *2nd stop*) només s'empra per expulsar la totalitat del líquid. **Si s'omple la punta de pipeta estrenyent fins a l'últim límit**, es pren més volum del seleccionat i es produeix un error per excés.
5. Per tal d'expulsar el volum retingut, situar la punta en el contenidor de destinació i prémer l'embol amb suavitat fins al segon límit.
6. Un cop finalitzat, descartar la punta polsant el dispositiu expulsador (*tip ejector button* en l'esquema).

En general, en l'ús de les pipetes cal evitar:

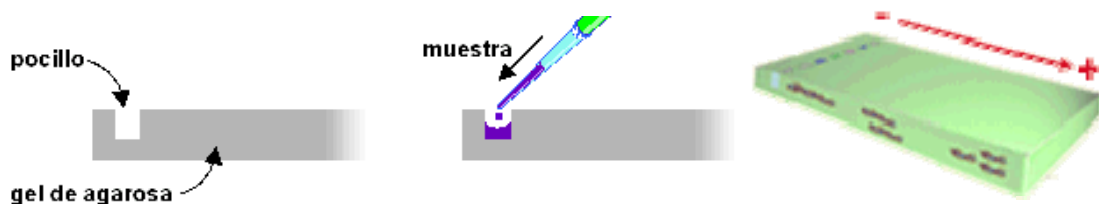
- Invertir o inclinar excessivament la pipeta ja que redueix la seva precisió i, si està plena de líquid, aquest es pot introduir en el seu mecanisme.
- Tractar la pipeta amb brusquedat en agafar-la i deixar-la, ja que els cops bruscos afecten la seva precisió.
- Que la punta de la pipeta contacte amb altres elements com les mans, la roba, bancada, etc. Això pot provocar una contaminació de la punta i en conseqüència, de la solució a manipular.

SEPARACIÓ D'ADN MITJANÇANT GELS D'AGAROSA

L'electroforesi és una tècnica que permet la separació de molècules en funció de la seva diferent mobilitat en un camp elèctric. En determinats suports, com el gel d'agarosa, el medi (gel) ofereix una resistència notable a l'avanç de les molècules, per la qual cosa la mobilitat depèn principalment de la grandària de la molècula.

L'agarosa és un polisacàrid (originalment obtingut d'algues, com l'agar-agar, però de composició més homogènia) i les dissolucions (típicament de 0,5 a 2%) tenen la propietat de romandre líquides per sobre d'aproximadament 50°C i formar un gel, semisòlid, en refredar-se. Aquest gel està constituït per una matriu o trama tridimensional de fibres polimèriques, embeguda en gran quantitat de líquid, que ofereix resistència al pas de les molècules d'àcid nucleic. Aquesta resistència serà més gran com més grans siguin les molècules amb la consegüent separació de les molècules en funció de la seva grandària.

En preparar el gel refredant l'agarosa en un motlle adequat, s'hi deixen uns buits o pouets per poder-hi introduir després la mostra. Quan apliquem el camp elèctric la mostra serà forçada a introduir-se en el gel (vist de perfil):



Durant l'electroforesi, les molècules d'ADN, que posseeixen càrrega negativa, migren cap a l'elèctrode positiu. En avançar les molècules d'ADN, la seua velocitat es veu reduïda per la matriu del gel d'agarosa. Les molècules més petites es mouen més de pressa que les més grans a través dels porus del gel.

Quan s'ha completat l'electroforesi, les molècules d'ADN es poden observar mitjançant l'addició d'un colorant específic, com el bromur d'etidi que s'intercala entre les molècules d'ADN i és fluorescent sota la llum ultraviolada (UV).

Existeixen patrons (també coneguts com a marcadors) especials que contenen una barreja de molècules de mida coneguda. Si es fa l'electroforesi d'un marcador conjuntament amb una mostra desconeguda, les bandes observades en el marcador poden ser comparades amb les obtingudes en la mostra desconeguda per determinar la seva mida.

EXERCICIS PRÀCTICS

1. - Amb quina pipeta realitzaries les següents mesures?

502 μ l ,

200 μ l,

80 μ l

8 μ l

2,5 μ l

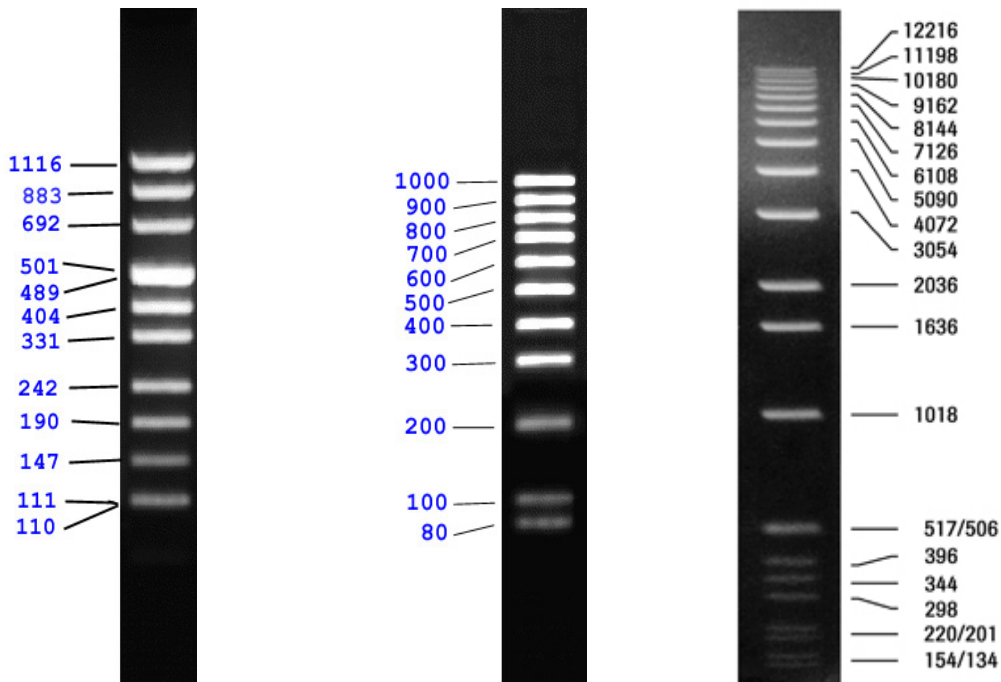
2. - Afegir en un tub les següents quantitats i comprovar el volum final amb la pipeta p1000:

10 μ l + 80 μ l + 610 μ l = 700 μ l

10 μ l + 40 μ l + 300 μ l = 350 μ l

3. - Carregar en un gel d'agarosa a l'1% diferents mostres d'un patró de pesos moleculars d'ADN. A partir dels següents esquemes determinar quines s'han emprat.

VIII 100pb X



SESSIÓ 2: Determinació del perfil genètic (part 1)

Activitats

- Extracció d'ADN a partir de saliva
- Comprovació mitjançant gel d'agarosa

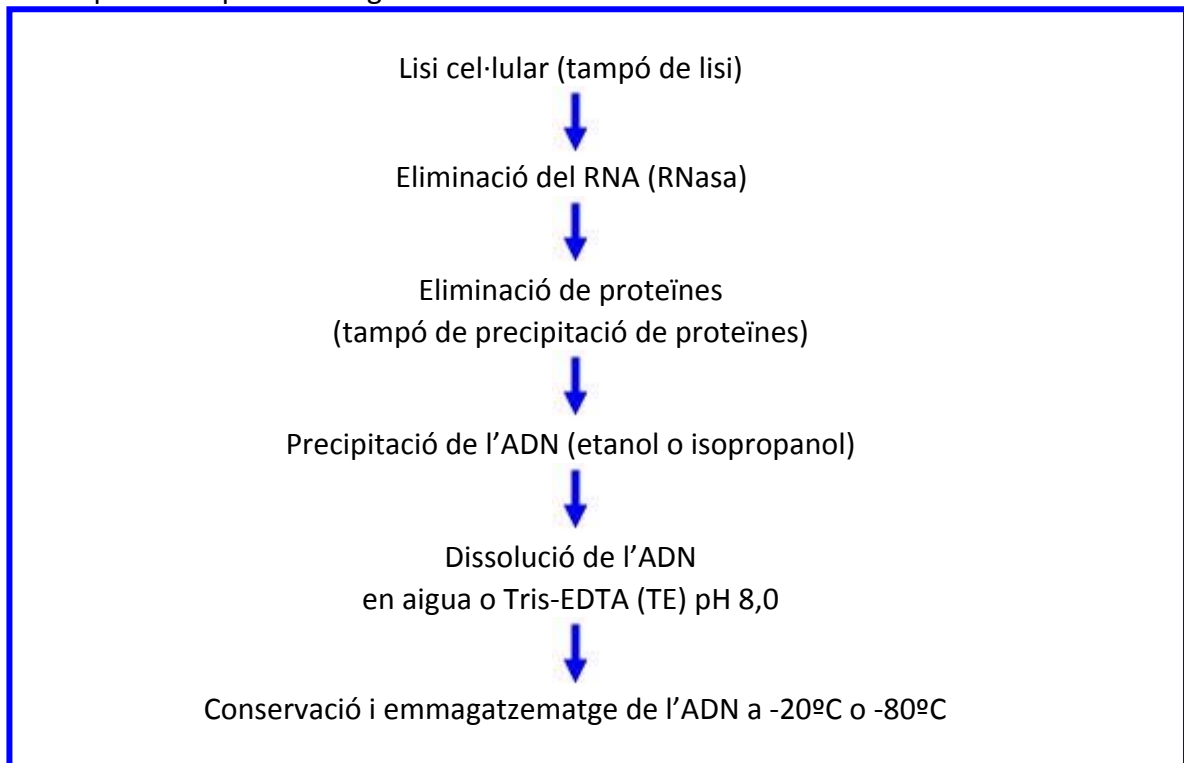
EXTRACCIÓ D'ADN GENÒMIC HUMÀ A PARTIR DE CÈL·LULES EPITELIALS DE MUCOSA BUCAL

És possible obtenir una mostra d'ADN genòmic d'un individu sense utilitzar tècniques que resulten tan invasives com l'extracció de sang. En aquesta pràctica utilitzarem cèl·lules epitelials de la mucosa bucal per extreure'n l'ADN. Se seguirà un protocol ràpid en què s'ha suprimit el pas de purificació amb solvents orgànics per tal d'evitar la pèrdua d'ADN.

Característiques del mètode a emprar

- Mètode ràpid i econòmic.
- Mètode segur, ja que elimina completament la necessitat d'utilitzar reactius tòxics.
- Permet processar diferents mostres biològiques.
- S'obté un ADN vàlid com a motlle en la reacció de PCR.

Esquema de procés a seguir:



PROTOCOL DE LABORATORI 1

Presa de mostra i preparació de les cèl·lules per a la lisi

1. Esbandir-se la boca amb aigua durant 10 segons i esperar uns minuts per recollir la mostra. Salivar una mica i recollir la saliva en un recipient estèril.
2. Pipetejar lentament 400 µl de la mostra en un tub de microcentrífuga (1,5 ml) i centrifugar durant 90 segons a 14.000 rpm. Decantar el sobrenedant deixant 10-20 µl de líquid residual.
3. Resuspendre amb un vòrtex el pellet de cèl·lules. Aquest procés ajudarà a optimitzar la lisi cel·lular del pas següent.

Lisi cel·lular

4. Afegir 400 µl de solució de lisi, barrejar amb vòrtex i incubar a 37°C durant 5 minuts.

Eliminació del RNA

5. Afegir 10 µl de solució de RNAsa (10mg/ml). Barrejar per inversió i incubar 20-45 minuts a 37°C.

Precipitació de proteïnes

6. Temperar la mostra a temperatura ambient (aproximadament 2 minuts) i afegir 240 µl de solució de precipitació proteica.
7. Agitar vigorosament amb vòrtex.
8. Centrifugar a 14.000 rpm durant 4 minuts. Si s'observen partícules surant tornar a centrifugar prèvia incubació de 5 minuts en gel.

Recuperació de l'ADN en solució i precipitació

9. Traspasar el sobrenedant (aproximadament 400 µl) a un nou tub amb 400 µl d'isopropanol.
10. Barrejar per inversió i incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.
11. Centrifugar a 14.000 rpm durant 2 minuts. L'ADN serà visible com un precipitat blanc.
12. Eliminar el sobrenedant per decantació, mirant de no perdre el precipitat, i rentar amb 300 µl d'etanol al 70% per facilitar la posterior dissolució de l'ADN.
13. Centrifugar a 14.000 rpm durant 1 minut. Eliminar acuradament el sobrenedant. Assecar el tub de forma breu amb paper absorbent i en bomba de buit durant 3-5 min.
14. Dissoldre el precipitat en 50-100 µl de TE (Tris-EDTA). Aquest volum suposarà l'ADN purificat que s'emprarà en els propers protocols. Es pot incubar a 37-50°C per aconseguir la perfecta dissolució de l'ADN. Etiquetar i guardar a -20 °C.

COMPROVACIÓ MITJANÇANT GEL D'AGAROSA

Per comprovar l'extracció es carregarà l'ADN extret en un gel d'agarosa al 0,8% preparat prèviament. Per a això:

1. Barrejar 2 μ l de l'ADN genòmic obtingut amb 3 μ l d'aigua destil·lada i 1 μ l de tampó de càrrega (responsable de caldrejar la mostra i dotar-la de densitat).
2. En el mateix gel, es carregaran 3 μ l d'un patró d'ADN de mides conegudes.
3. Córrer el gel 30 minuts a 100 volts.
4. Transcorregut aquest temps observar/fotografiar el gel sota una llum ultraviolada.

PROBLEMES MÉS FREQUENTS EN L'OBTENCIÓ D'ADN

- Poca obtenció d'ADN, a causa de:
 - Insuficient nombre de cèl·lules en la mostra inicial
 - La lisi cel·lular no ha estat completa (allargar la lisi fins a obtenir una solució més homogènia).
 - Les cèl·lules no han estat ben preparades per a la lisi. Cal dissoldre els grumolls de cèl·lules prèviament a l'addició de la solució de lisi.
- Pèrdua d'ADN durant l'extracció.

SESSIÓ 3: Determinació del perfil genètic (part 2)

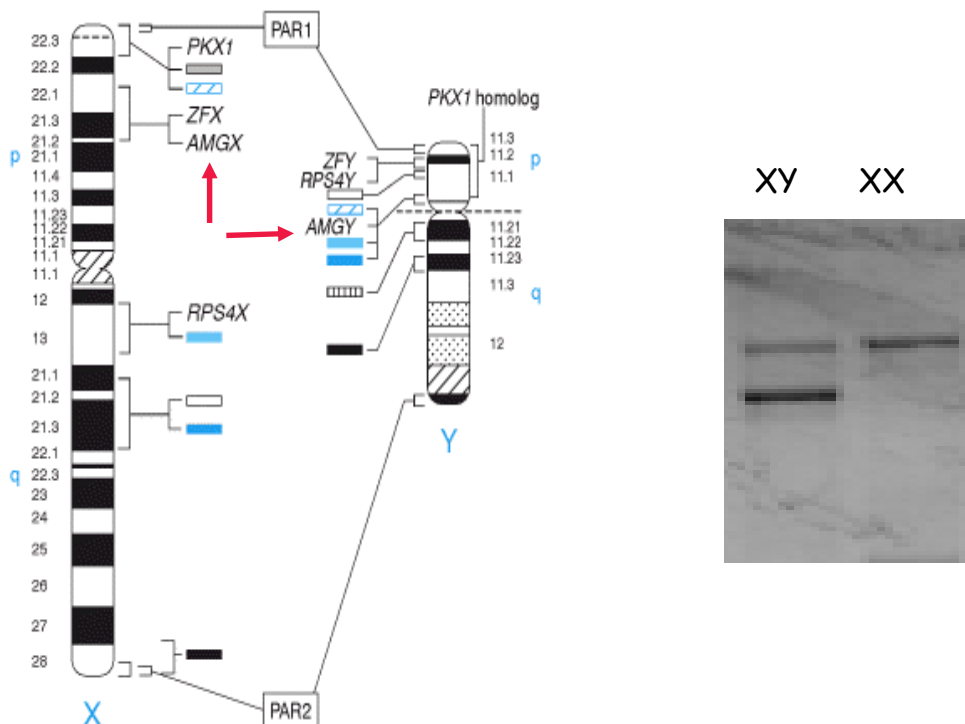
Activitats

- PCR per *locus* amelogenina
- PCR per *locus* DRD4
- Determinació de grups sanguinis

PCR PER LOCUS AMELOGENINA

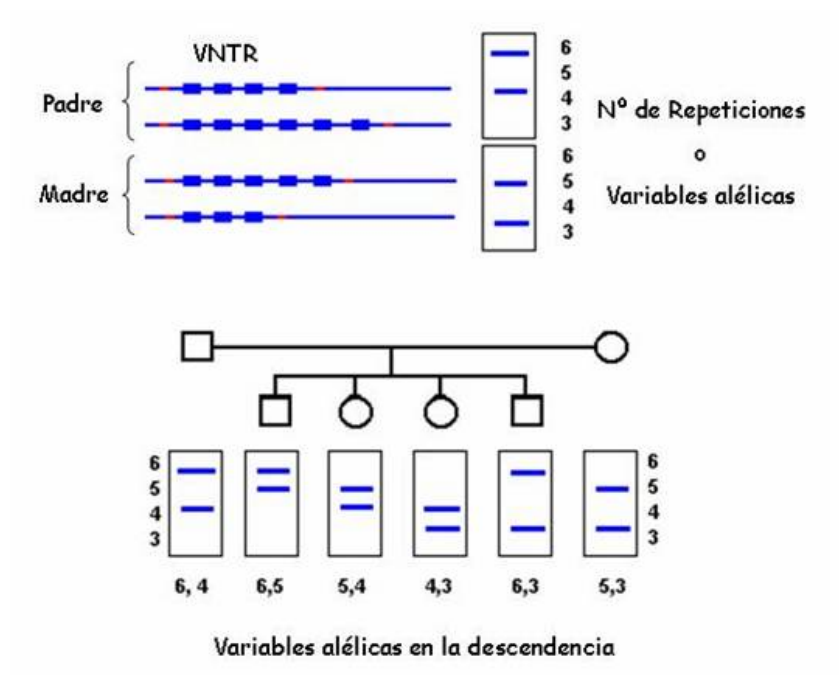
És possible identificar els cromosomes X i Y d'un individu del qual només disposem d'una mostra amb uns pocs nanograms d'ADN. Per això recorrem a la **reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**, que ens permet amplificar seqüències concretes d'ADN. Analitzarem el *locus* amelogenina. Des del punt de vista del seu ús com a marcador és útil per determinar el sexe. Això és degut que aquest gen està present tant en el cromosoma sexual X com en el Y, encara que les seves característiques són diferents en funció del cromosoma en què es trobe. Per a aquest gen hi ha una deleció d'aproximadament 170 pb en el cromosoma Y. Açò permet que una reacció de PCR que contingui aquesta regió mostre diferents mides en els fragments d'ADN amplificats en funció que la mostra vingui d'individus XX (dona) o individus XY (home).

Per a cada mostra drem a terme 1 reacció d'amplificació del *locus* de l'amelogenina.



PCR PER LOCUS VNTR-DRD4

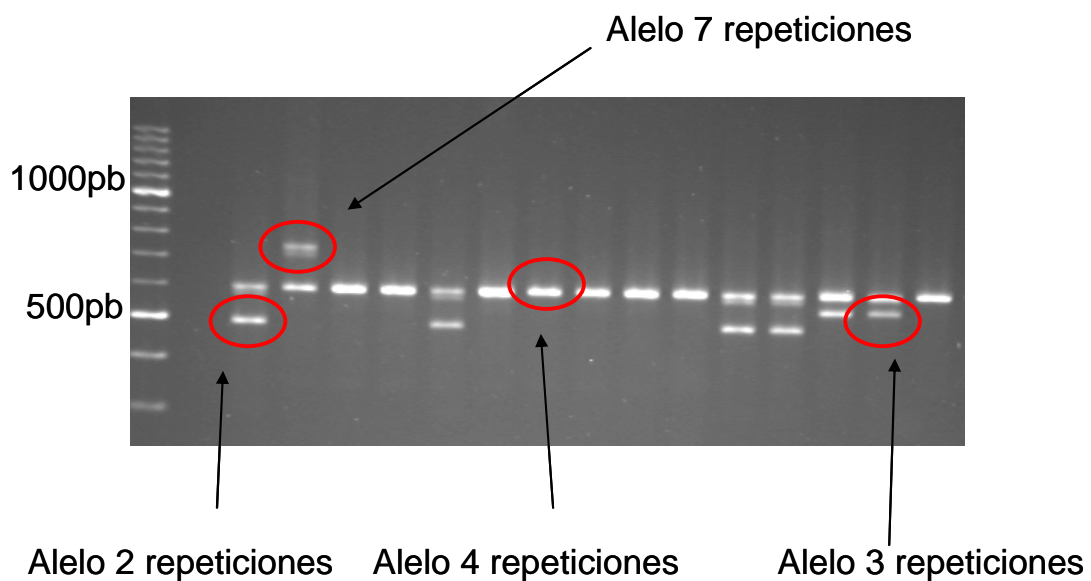
Es denomina *loci* VNTR (de l'anglès "Variable Number of Tandem repeats") les repeticions en tàndem de nombre variable. Una repetició en tàndem és una seqüència curta d'ADN que es repeteix consecutivament. Aquestes repeticions es troben repartides pel genoma i un mateix tipus de repetició es pot trobar en un únic lloc (*locus* únic) o en múltiples llocs. El nombre d'unitats que es repeteixen dins d'un VNTR variarà entre individus. Aquest fet ens permet caracteritzar un individu en funció del nombre de repeticions que tinga a un determinat *locus* VNTR en el seu ADN. La possibilitat que 2 individus tinguin el mateix perfil (el mateix nombre de repeticions) per a un mateix *locus* (depèn del nombre d'al·lels i la seva freqüència) és relativament alta, però aquesta probabilitat va disminuint a mesura que s'augmenta el nombre de *loci* VNTR analitzats. Quan s'usen els perfils d'ADN amb fins medicolegals, s'analitzen de 4 a 6 *loci* VNTR diferents, cosa que ens dóna una possibilitat extremadament baixa de trobar un mateix perfil per a tots els *loci* analitzats. Cal tenir en compte que aquest tipus de marcadors han estat desplaçats pels marcadors STR (Short Tandem Repeats), encara que el seu tractament i amplificació són similars.



En aquest cas anem a estudiar el perfil per al polimorfisme VNTR del gen DRD4 (Receptor D4 de la dopamina). Fem servir aquest en concret ja que presenta un polimorfisme (variabilitat entre individus) relativament alt i els seus diferents al·lels es poden distingir fàcilment en gels d'agarosa.

Les seves característiques i possibles resultats són:

- Repeticions de 48 Nucleòtids (ACCCGCGCCCCGCCTCCCCCAGGACCCCTGC
GGCCCCGACTGTGCGCC)
- Cada al·lel es caracteritza per un nombre de repeticions, cosa que identifica la seva grandària.
- Grandària de fragments amplificats: 374 pb + VNTR:
2 rep: 470 pb 3 rep: 518 pb 4 rep: 566 pb
5 rep: 614 pb 6 rep: 662 pb 7 rep: 710 pb
8 rep: 759 pb 9 rep: 806 pb 10 rep: 854 pb.



PROTOCOL DE LABORATORI 3

1. En un tub estèril, especial per PCR afegir els següents components en l'ordre indicat:

	1 tub x 1	Mix x 20
PCRmix 2x (conté Taq, dNTPs i tampó)	12,5 µl	
DMSO 50%	5 µl	
Primers DRD4 (10 µM)	1 µl+1 µl	
DNA	1	
Aigua MQ	4,5 µl	
Volum total	25 µl	

2. Agitar els tubs perquè es barregin els reactius i procedir a la reacció d'amplificació d'acord amb el següent programa:

94 ° x 1 ' }
94 ° x 30 " }
64 ° x 1' } x 35 cicles
72 ° x 1' }
72 ° x 7 ' }

3. Una vegada finalitzada l'amplificació les mostres es guardaran a -20°C per ser analitzades mitjançant gel d'agarosa en la quarta sessió.

DETERMINACIÓ DE GRUP SANGUINI ABO

La sang de cada persona presenta característiques particulars que pot servir com un mitjà d'identificació gairebé tan precís com les empremtes dactilars. Com passa amb l'ADN, només els bessons idèntics tenen característiques sanguínies iguals. En l'actualitat hi ha descrit o un gran nombre de grups sanguinis diferents, com ara el sistema ABO, el Rhesus (Rh), el MN o el Ss, entre d'altres. La identificació dels grups sanguinis ha estat de gran rellevància no només per a la determinació de la compatibilitat en les transfusions sanguínies sinó en els estudis genètics en poblacions humanes.

El sistema més conegut és el ABO, ja que té una gran importància en la determinació d'incompatibilitats entre la sang de diferents individus. Això es basa en una reacció de caràcter immunològic altament específica que consisteixen en la unió d'antígens estranys (antígens A o B, en funció del donant) continguts en els eritròcits del donant i els anticossos específics presents en el plasma sanguini del receptor.

El grup sanguini ABO el determina un *locus* situat en el cromosoma 9. Hi ha tres al·lels diferents per a aquest locus:

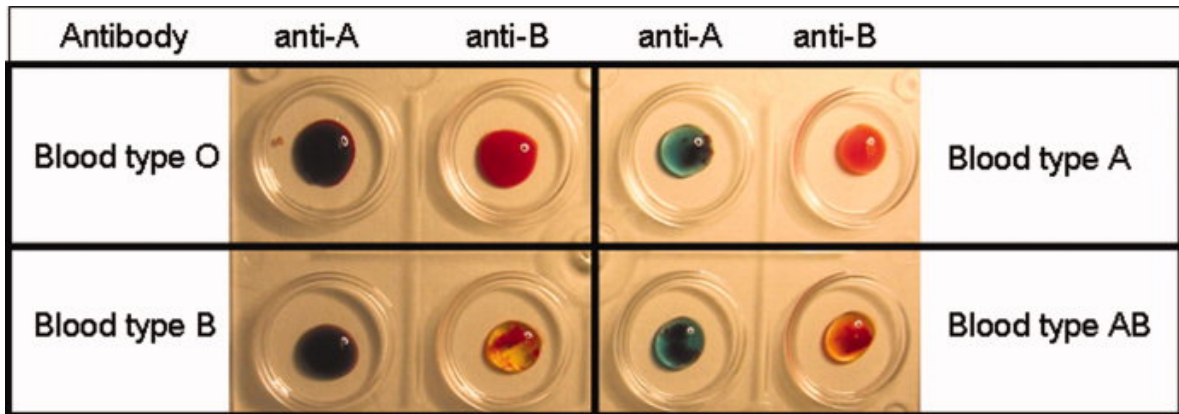
- I^A , dóna lloc a la producció d'antígens A.
- I^B , dóna lloc a la producció d'antígens B.
- i , que determina la no producció d'antígens.

Els al·lels I^A i I^B són codominants, i l'al·lel i és recessiu davant I^A i I^B . Aquestes característiques determinen l'existència de quatre fenotips possibles:

Fenotips	Genotips	Antígens	Anticossos
A	$I^A I^A$ o $I^A i$	A	anti-B
B	$I^B I^B$ o $I^B i$	B	anti-A
O	ii	cap	anti-A i anti-B
AB	$I^A I^B$	A i B	cap

Les persones que tenen en els seus eritròcits un tipus d'antigen, no tenen l'anticòs respectiu, però aquest últim és present en el sèrum de les persones que no tenen aquest antigen. Per tant, en una transfusió es produirà reacció d'aglutinació antigen-anticòs o no segons els casos.

La determinació del grup sanguini del sistema ABO s'efectua enfrontant els hematies problema amb antisèrums d'especificitat coneguda: anti-A i anti-B. L'aglutinació o no aglutinació dels hematies assajats davant cada un dels antisèrums és indicativa de la presència o absència dels corresponents antígens. A la figura es poden observar els resultats esperats per a cada combinació d'anticòs-grup sanguini



Biochemistry and Molecular Biology Education

Volume 36, Issue 5, pages 347-353, 18 SEP 2008 DOI: 10.1002/bmb.20218
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.20218/full#fig2>

PROTOCOL DE LABORATORI 4

Per determinar el grup seguirem els següents passos:

1. En una de les plaques de pouet múltiple, retolar 2 pouets amb anti-A i anti-B.
2. Amb una llanceta estèril realitzar una punció en un dels laterals del dit índex d'una mà, prèviament esterilitzat amb un cotó amarat en etanol.
3. Dipositar en cada pouet una petita gota de sang.
4. Afegir ràpidament 20 µl de cada antisèrum en el seu respectiu pouet (en un dels costats).
5. Amb un furgadents, barrejar bé la sang amb l'antisèrum. Emprar un furgadents diferent per a cada pouet.
6. Mantenir la placa a temperatura ambient durant 1-2 minuts. Transcorregut aquest temps, observar la presència o absència d'aglutinació.

SESSIÓ 4: Determinació del perfil genètic (part 3) i anàlisi dels resultats

Activitats

- Separació de fragments d'ADN en gels d'agarosa per a la identificació dels cromosomes sexuals
- Separació de fragments d'ADN en gels d'agarosa per a la determinació dels polimorfismes VNTR-DRD4
- Determinar a qui correspon la mostra problema

SEPARACIÓ DE FRAGMENTES D'ADN EN GELS D'AGAROSA PER A LA IDENTIFICACIÓ DELS CROMOSOMES SEXUALS

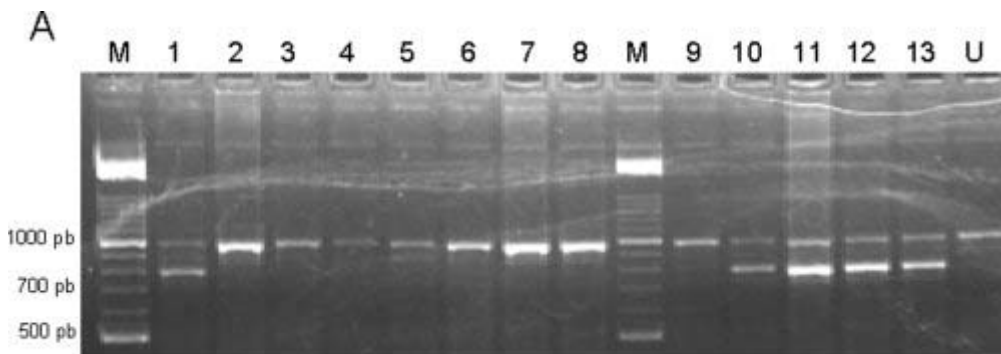
CONTINUACIÓ DEL PROTOCOL DE LABORATORI 2

5. Preparar un gel d'agarosa a l'1% (p/v). Deixar gelificar uns 20-30 minuts.
6. Carregar, al gel, 10 µl de la reacció de PCR a la qual s'afegeixen 2 µl de tampó de càrrega. Utilitzar un marcador de pes molecular (afegir 6 µl per carrera).
7. Córrer el gel a 90 V durant 1 hora en tampó TBE 0.5X amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 mg/ml.
8. Fotografiar el gel i analitzar els resultats.

Resultats esperats:

Sexe XX: obtindrem una banda de 977 bp.

Sexe XY: obtindrem dues bandes, una de 977 bp i altra de 788 bp.



Biochemistry and Molecular Biology Education

Volume 36, Issue 5, pages 347-353, 18 SEP 2008 DOI: 10.1002/bmb.20218
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.20218/full#fig4>

SEPARACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA EN GELS D'AGAROSA PER A LA DETERMINACIÓ DELS POLIMORFISMES VNTR-DRD4

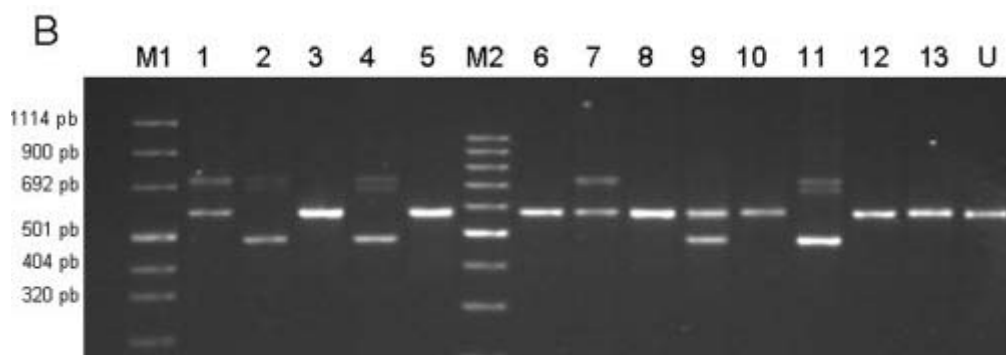
CONTINUACIÓ DEL PROTOCOL DE LABORATORI 3

5. Preparar un gel d'agarosa al 2% (p / v). Deixar gelificar uns 20-30 minuts.
6. Carregar, al gel, 10 µl de la reacció de PCR a la qual s'afegeixen 2 µl de tampó de càrrega. Utilitzar un marcador de pes molecular (afegir 6 µl per carrera).
7. Córrer el gel a 90 V durant 2 hores en tampó TBE 0.5X amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 mg/ml.
8. Fotografiar el gel i analitzar els resultats.

Resultats esperats:

- Grandària amplificats: 374 pb + VNTR:

2 rep: 470 pb	3 rep: 518 pb	4 rep: 566 pb
5 rep: 614 pb	6 rep: 662 pb	7 rep: 710 pb
8 rep: 759 pb	9 rep: 806 pb	10 rep: 854 pb.
- Les combinacions més freqüents en la població són: 4,4; 2,4; 4,7 i 2,7



Biochemistry and Molecular Biology Education

Volume 36, Issue 5, pages 347-353, 18 SEP 2008 DOI: 10.1002/bmb.20218

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.20218/full#fig4>

REFERÈNCIES:

Herrero S, Ivorra JL, García-Sogo M, Martínez-Cortina C. *Biochemistry and molecular biology techniques for person characterization*. **Biochem Mol Biol Educ**. 2008 Sep;36(5):347-53.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.20218/full>

Lorente, JA (2004). *Un detective llamado ADN: tras las huellas de criminales, desaparecidos y personajes históricos*. Ed. Temas de Hoy.

DNAi.org (DNA interactive): <http://www.dnai.org/index.htm>

Wikipèdia:

-PCR: http://ca.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3_en_cadena_de_la_polimerasa

-VNTR: <http://ca.wikipedia.org/wiki/VNTR>

-Grups sanguinis: http://ca.wikipedia.org/wiki/Grup_sanguini