

Short Tandem Repeats



Rita Fanelli



CeMedForVet

Centro di Referenza Nazionale
per la Medicina Forense Veterinaria

Variabilità Genetica e STR

a) variabilità di sequenza

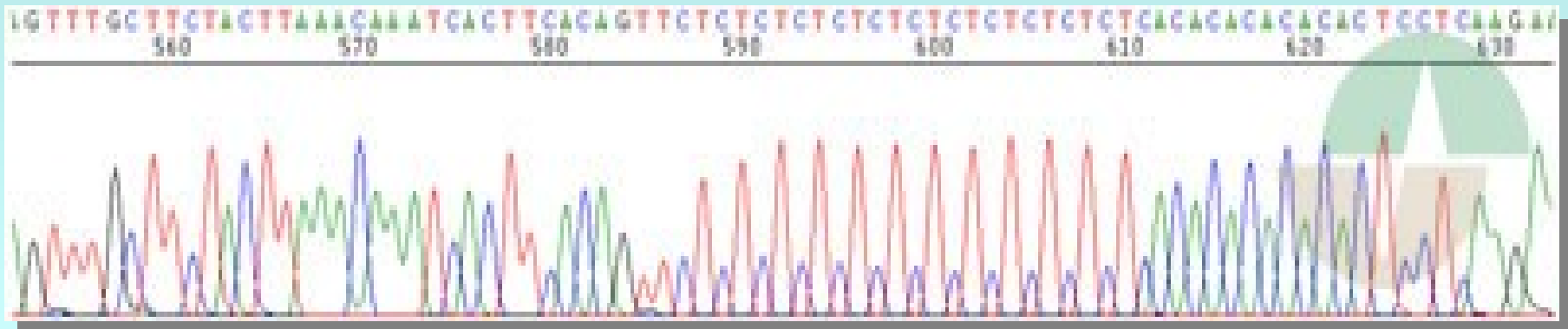
.....GAATCAAGGATC....

.....GAATGAAGGTTC.....

b) variabilità di lunghezza

...(CA)₂ (CA)₂(CA)₂(CA)₂...

..... (CA)₂(CA)₂(CA)₂.....



STR: sequenze di DNA non codificante costituite da unità molto corte (2-6 bp) ripetute in tandem.

TTCGGATGTAAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGGTAGCCTGA

SEQUENZA RIPETUTA **CT** *DINUCLEOTIDE*

TTCGGATGTAAAT**CTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACT**TCGGTAGCCTGA

SEQUENZA RIPETUTA CTA TRINUCLEOTIDE

TTCGGATGTAAAT**CTATCTATCTATCTATCTATCTAT**TCGGTAGCCTA

SEQUENZA RIPETUTA **CTAT** TETRANUCLEOTIDE

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

Alleli: le due o più forme alternative dello stesso gene

ALLELE 3 : AT CT CT CT TTCG (3 ripetizioni)

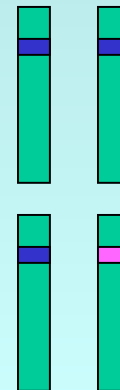
ALLELE 4 : AT CT CT CT CT TTCG (4 ripetizioni)

ALLELE 5 : AT CT CT CT CT CT TTCG (5 ripetizioni)

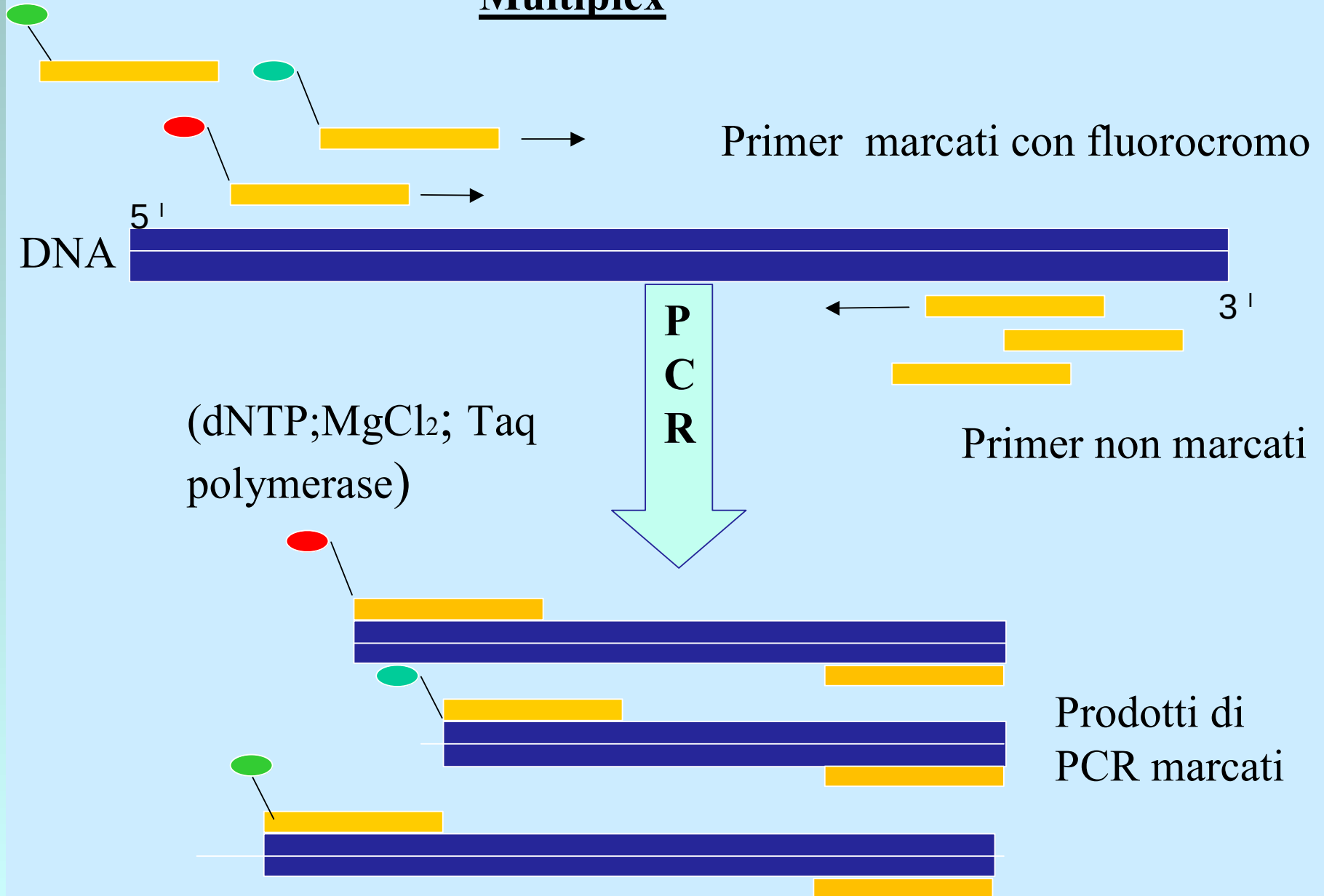
ALLELE 6 : AT CT CT CT CT CT CT TTCG (6 ripetizioni)

ALLELE 3 ALLELE 3 → OMOZIGOTE

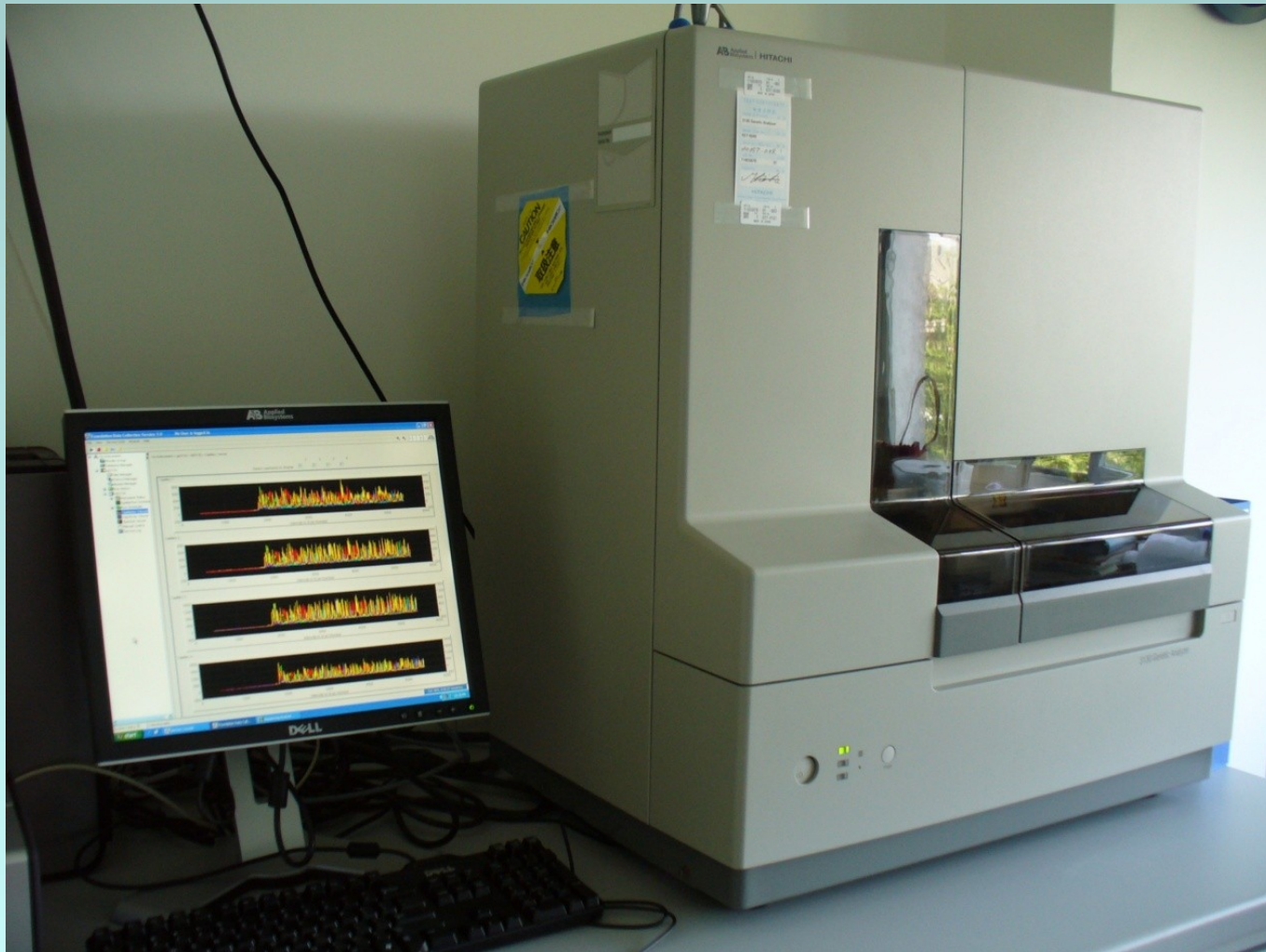
ALLELE 3 ALLELE 6 → ETEROZIGOTE

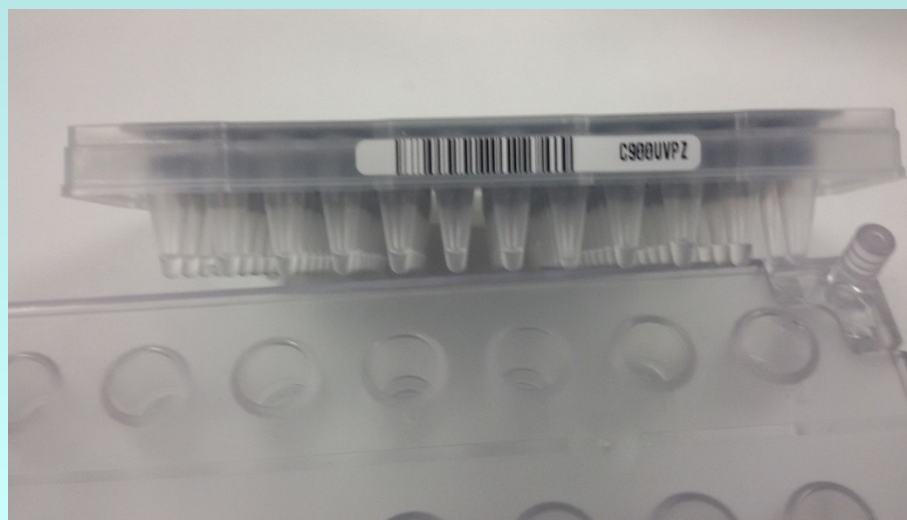


Multiplex



ANALISI DI FRAMMENTI



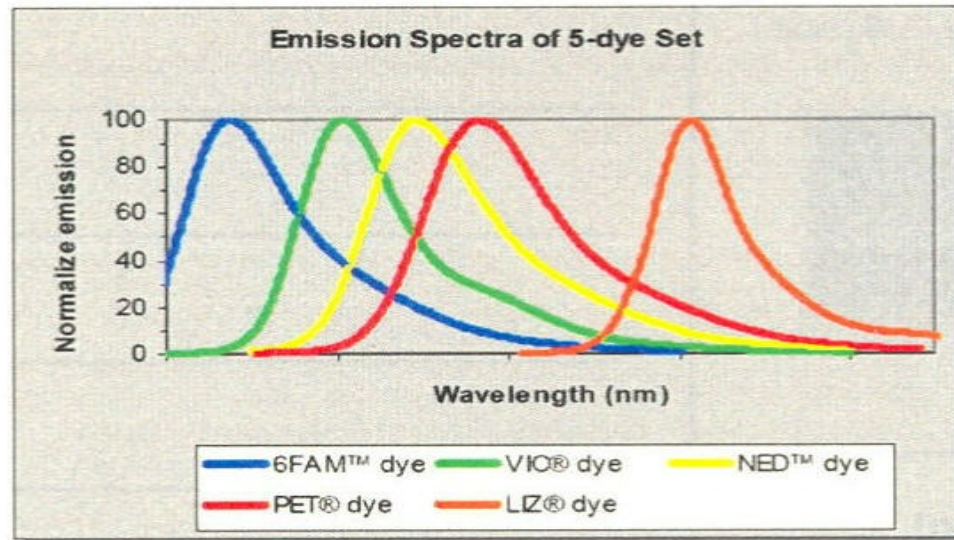




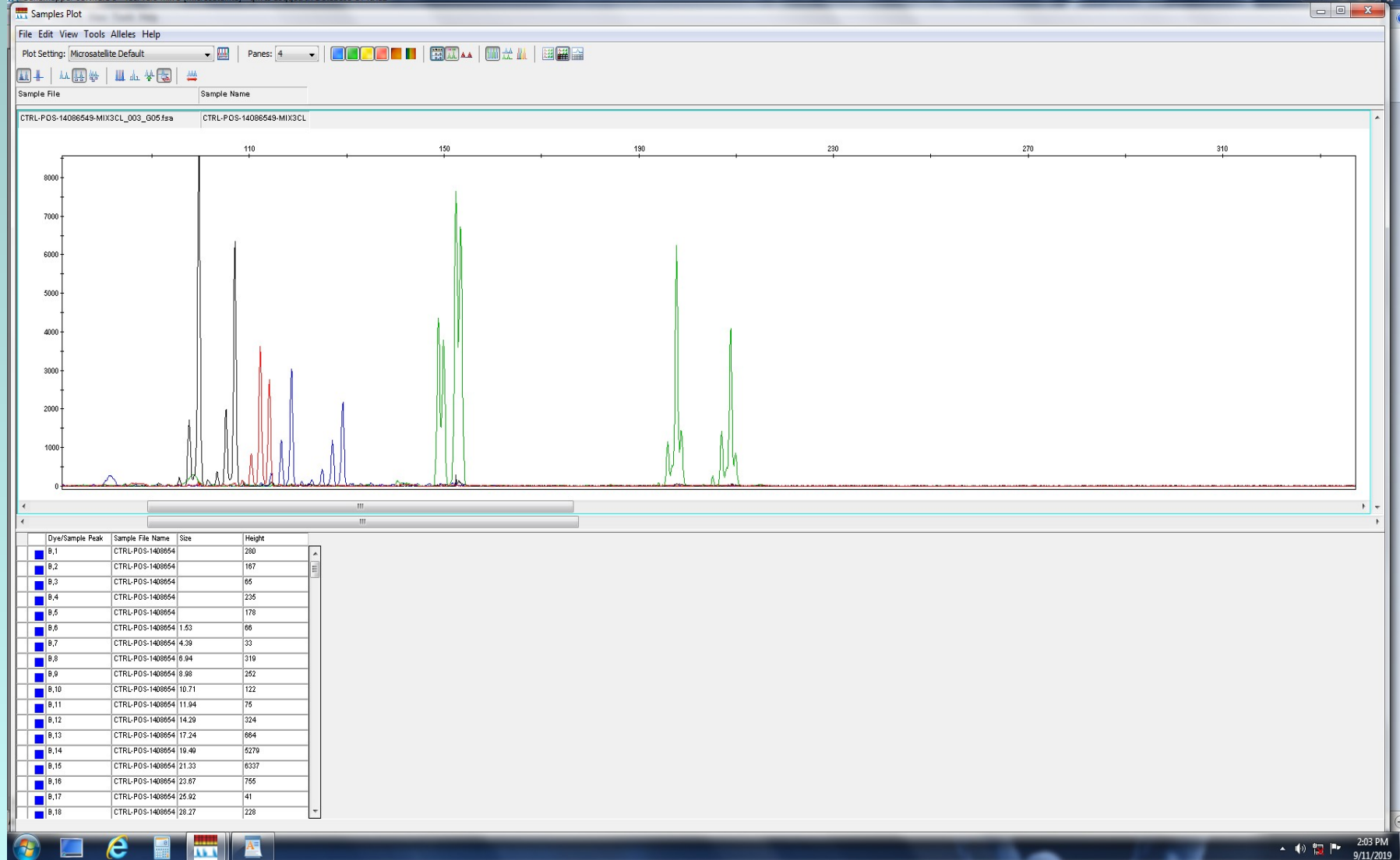
Size Standard:

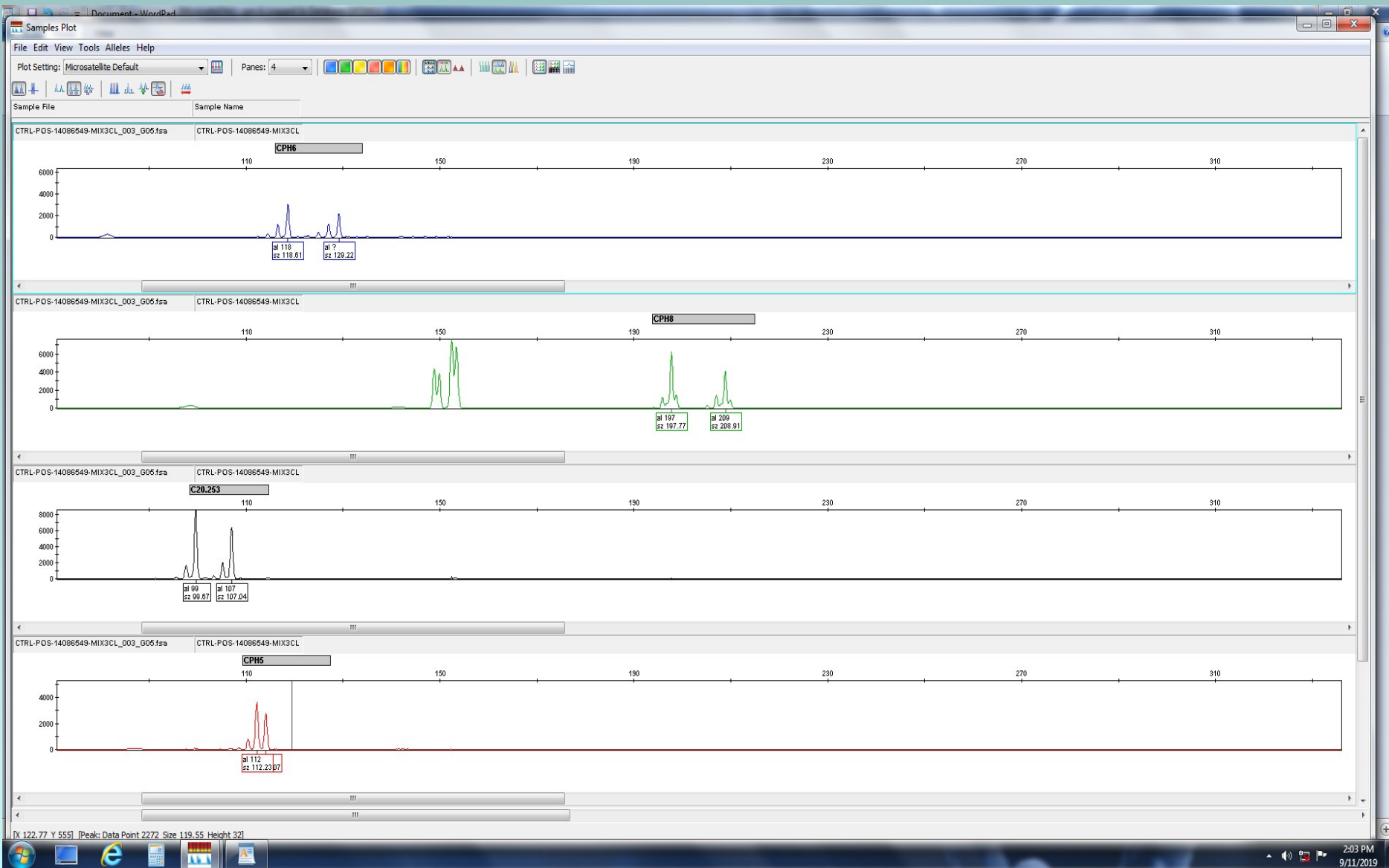
miscela di frammenti di lunghezza nota, colorati con un fluorocromo differente rispetto a quelli impiegati per gli alleli.

Fluorescent Dye Emission Spectra

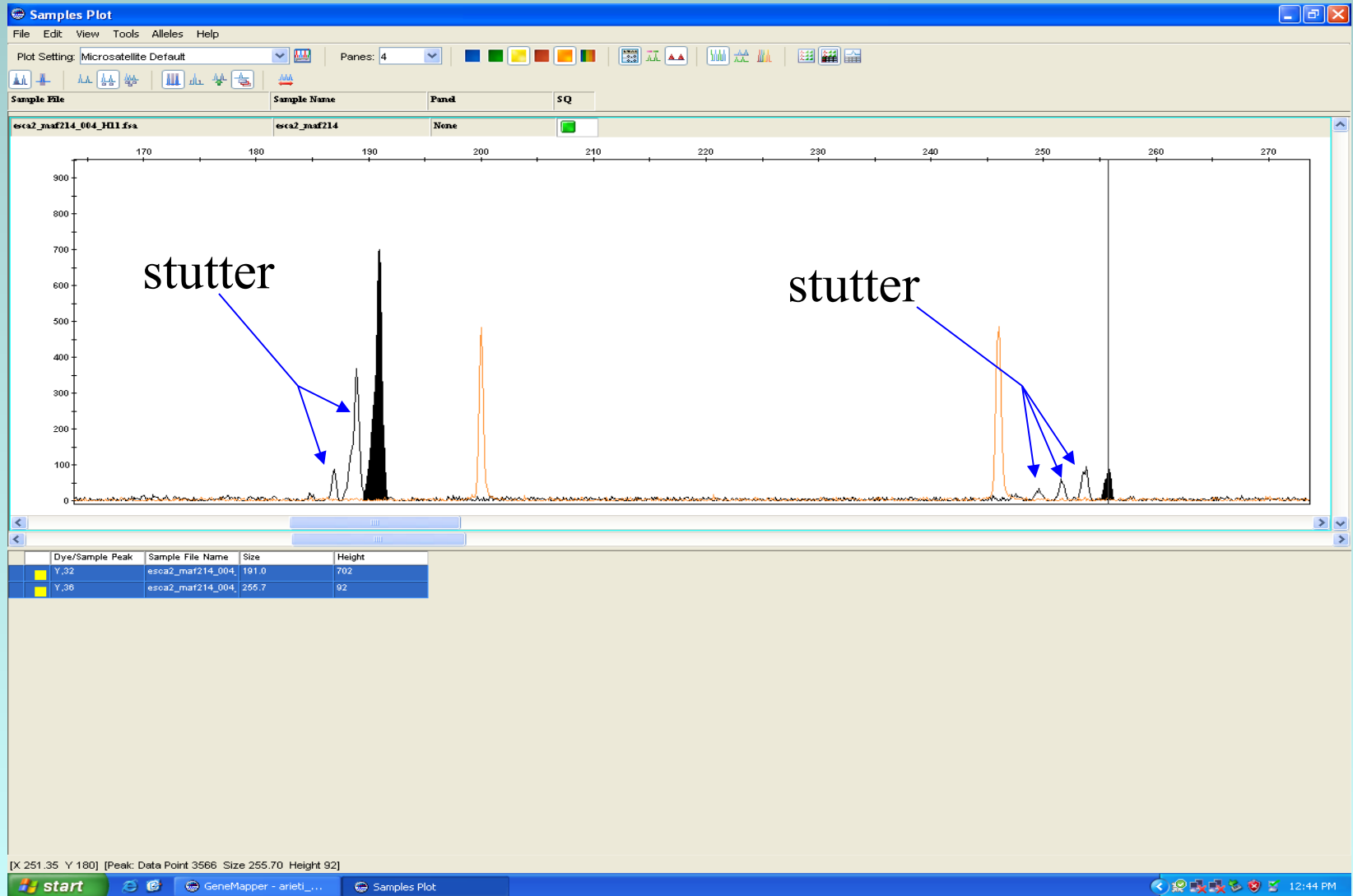


- The 4/5 dyes have distinct maximal emission wavelengths, but their emission spectra overlap
- This overlap must be compensated by spectral calibration



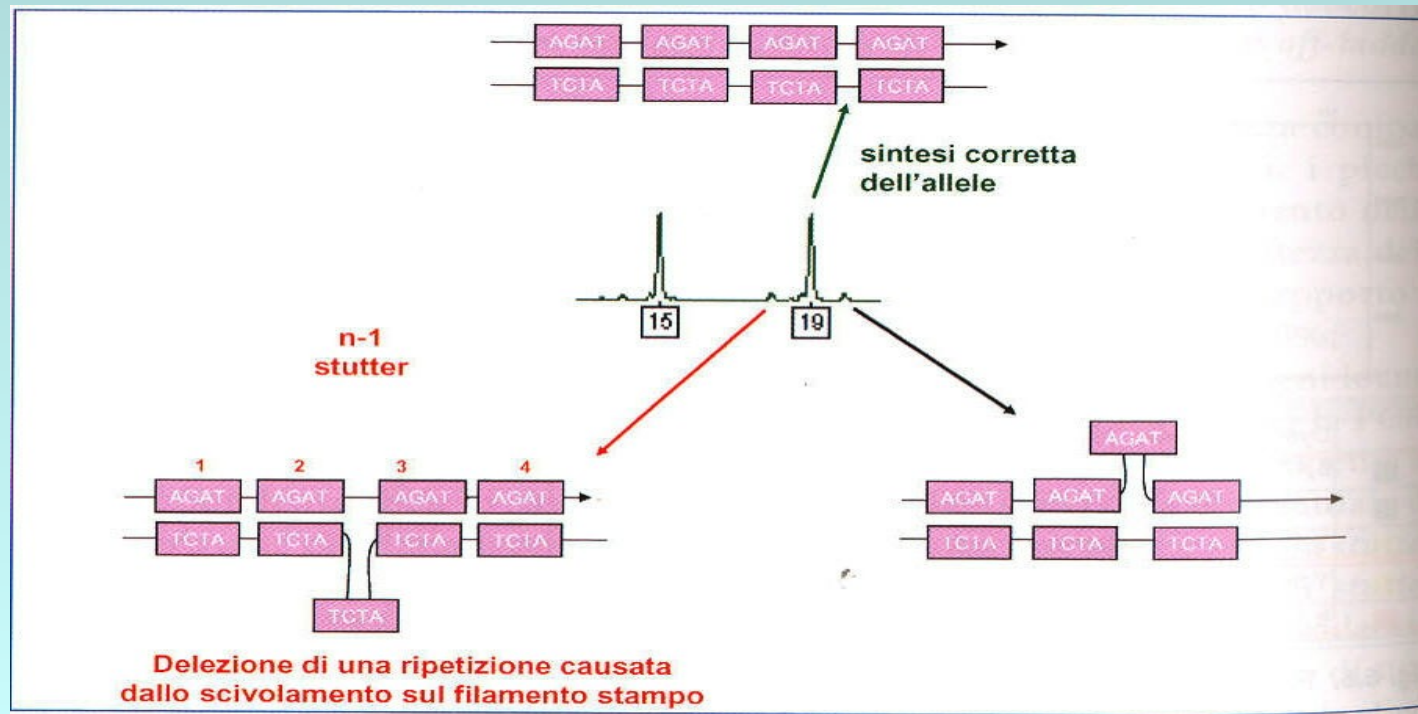


Stutter



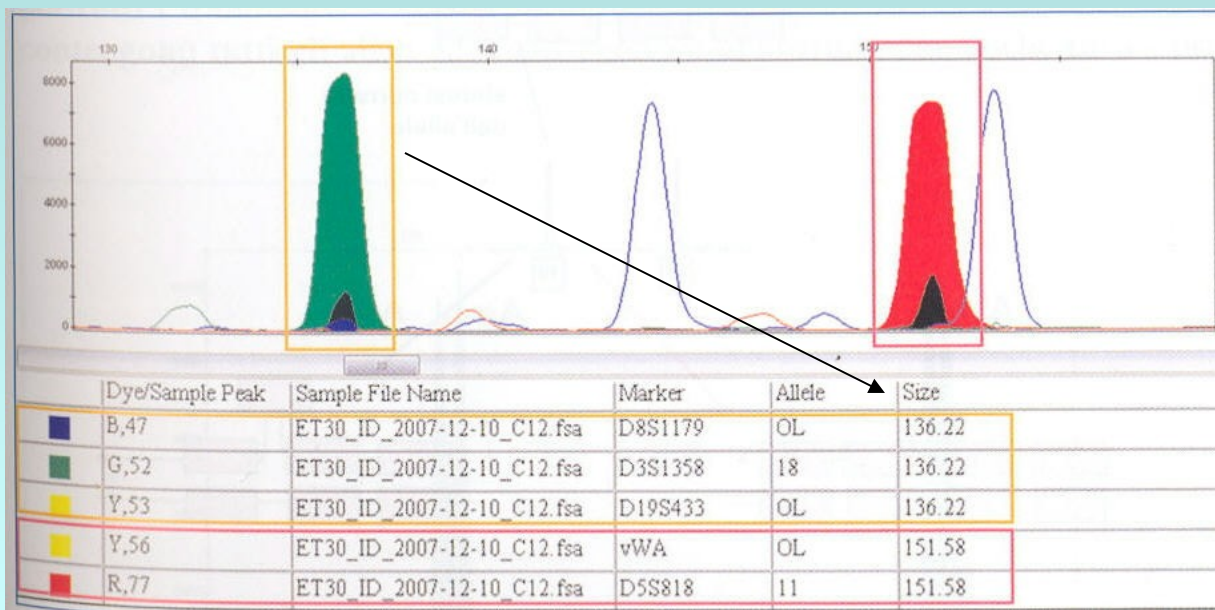
Le stutter sono dei picchi aspecifici dovuti alla produzione, durante la PCR, di un prodotto di amplificazione più corto di una o più ripetizioni rispetto all'allele corrispondente.

Vengono generate durante il processo di duplicazione del DNA in seguito a uno scivolamento della polimerasi sul filamento di DNA stampo.



Pull-up peaks

Pull-up peaks sono picchi che si formano quando si amplificano quantità eccessive di DNA. Il software non riesce a separare le emissioni dei diversi fluorocromi così si ha la presenza di picchi di altri colori della stessa taglia del picco allelico.



Allele drop-out

Mancata amplificazione dell'allele.

Dipende essenzialmente da una scarsa quantità di DNA.

In pratica anche se l'allele esiste non viene amplificato, così un campione eterozigote appare omozigote.

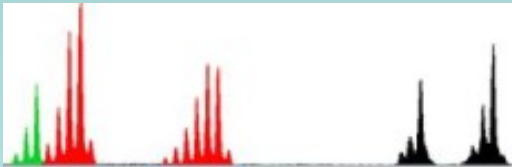
Da qui allele nullo.

SERVIZI DIAGNOSTICI

1 Genotipo individuale



OGNI INDIVIDUO E' CARATTERIZZATO DA UN PROPRIO PROFILO GENETICO CHE LO RENDE UNICO



1a) DNA match

1b) Identificazione delle forme selvatica/domestica della stessa specie e dei loro ibridi



SERVIZI DIAGNOSTICI

Paternità/Maternità



Parentela



BANCA DATI

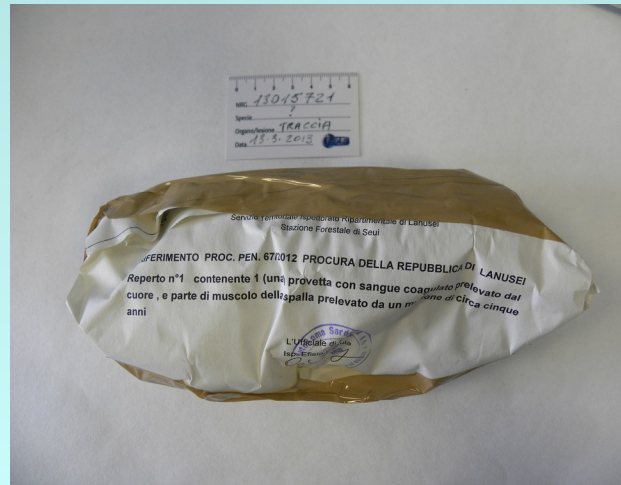
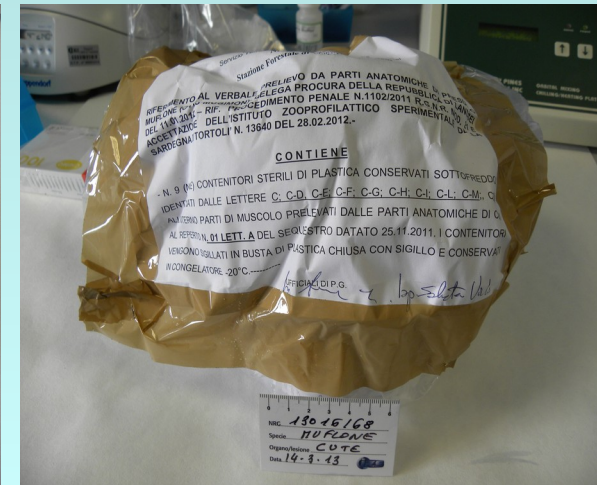


MUFLONE-OVINO
SUINO-CINGHIALE
CANE-LUPO

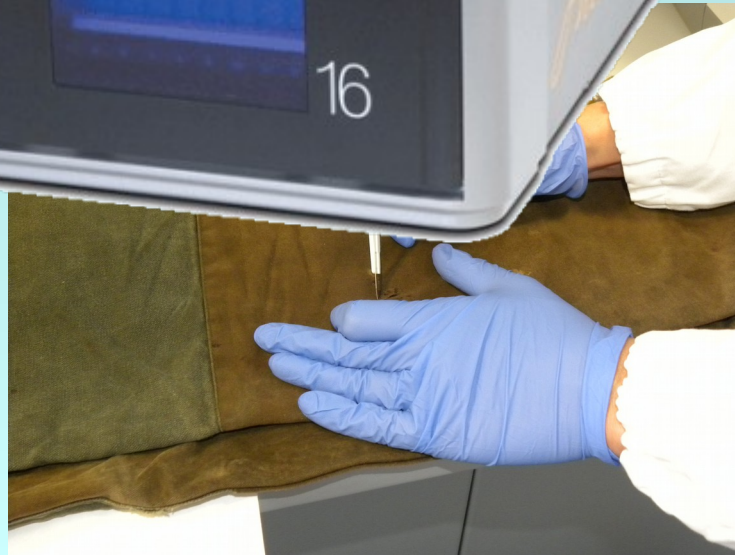
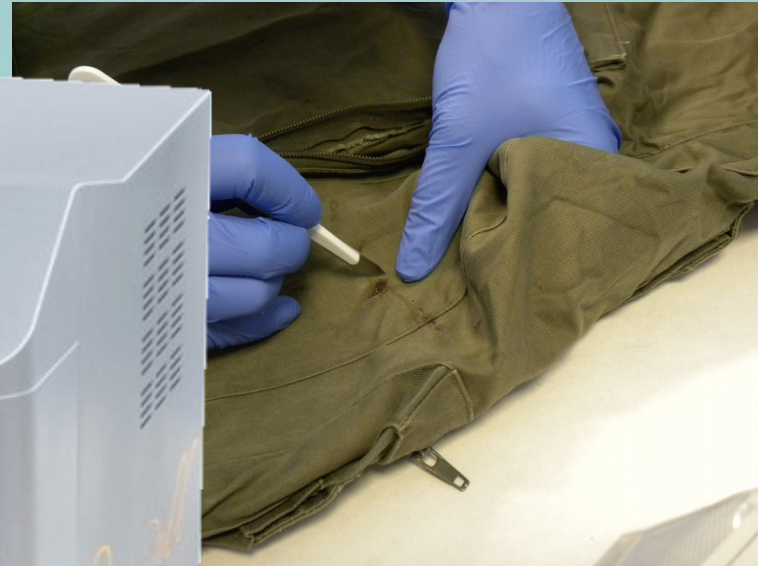
CASO BRACCONAGGIO MUFLONI



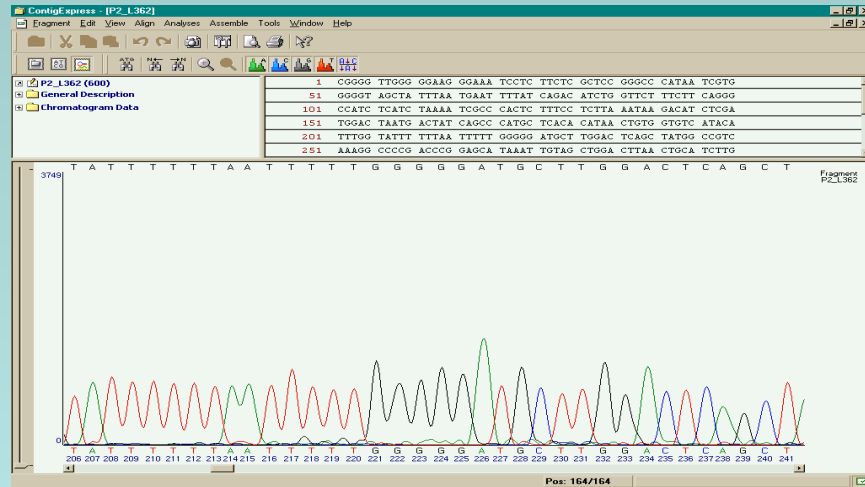
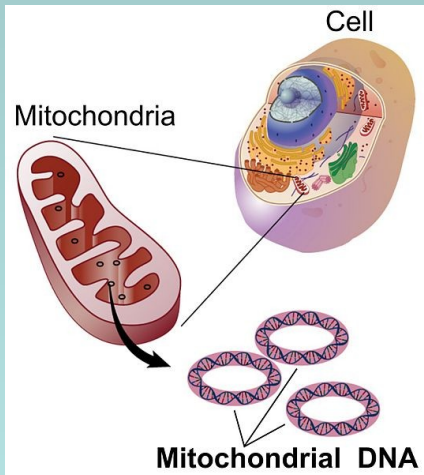
P.P. CORPO FORESTALE
E VIGILANZA AMBIENTE
DI SEUI.



CASO BRACCONAGGIO MUFLONI



Identificazione di specie mediante sequenziamento (mt DNA Cyt B):



Ovis aries



?



Sus scrofa

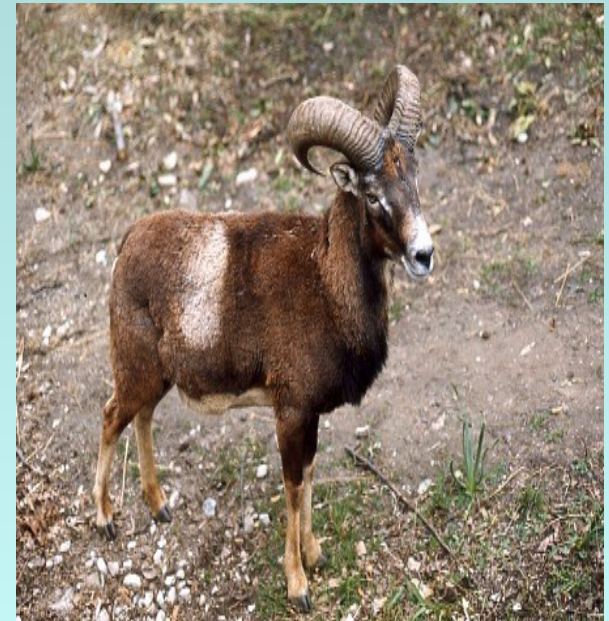




N 4 multiplex per un totale di 16 loci.



Oarcp49 :19 alleli
Csr247 :21 alleli
Inra63 :16 alleli
Hscb :16 alleli
Maf214 : 13 alleli
Oar20 :14 alleli
D5s2 :8 alleli
Inra23 :14 alleli
Mcm527 :10 alleli
Inra6 :10 alleli
Inra172 :10 alleli
Mcm42 :11 alleli
Inra49: 9 alleli
Ilst87 : 20 alleli
Tgla53 :12 alleli

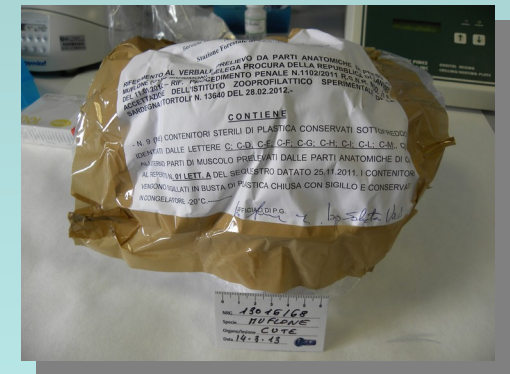
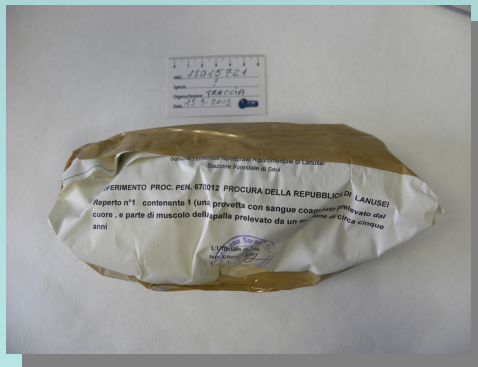




Test di assegnazione, statistica Bayesiana



DNA match



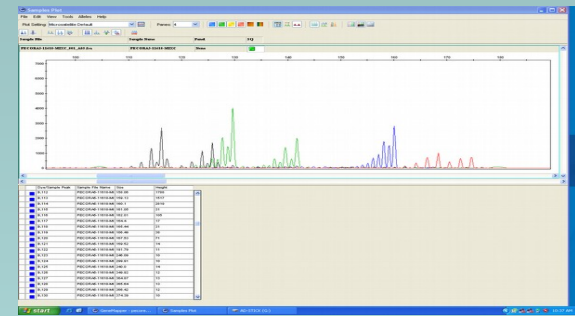
Per valutare statisticamente la corrispondenza tra i due profili (carcassa e traccia sullo scarponne) è stata effettuata un'analisi biostatistica. E' stato calcolato il Rapporto di Verosimiglianza, LR, attraverso la stima della " Random Match Probability, RPM".

Il valore di LR relativo al profilo genetico completo è risultato essere di $3,6 \times 10^{-5}$, con ciò indicando che è oltre 27000 volte più probabile che la traccia di sangue sullo scarponne sia stata lasciata dalla carcassa del muflone N.1, piuttosto che sia stata lasciata da un altro muflone preso a caso dalla popolazione.

ANALISI MICROSATELLITI

PESO STATISTICO DEL RISULTATO
(Test di assegnazione,
statistica Bayesiana)

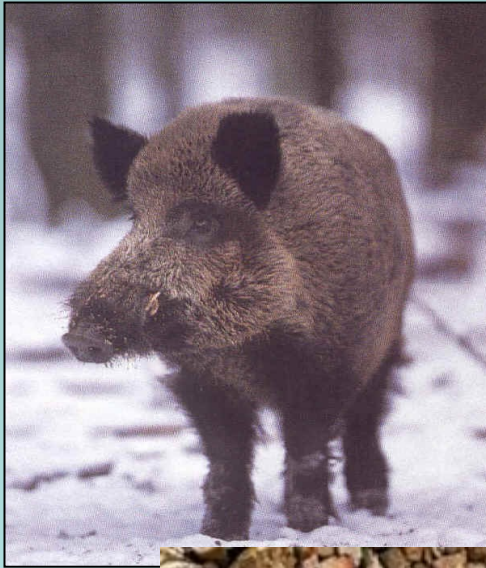
IDENTIFICAZIONE FORMA
SELVATICA, DOMESTICA, IBRIDA....
IDENTIFICAZIONE INDIVIDUO



SET 25 LOCI STR



SET DI 20 LOCI STR

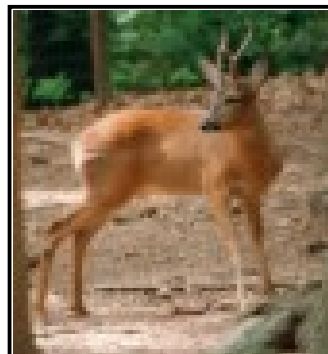




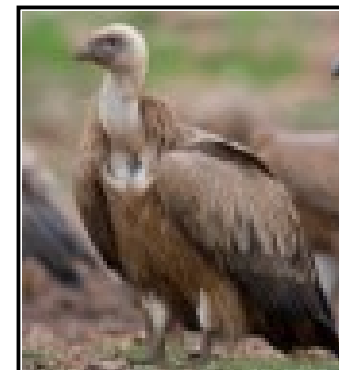
DATABASE STR IN-HOUSE per DIVERSE SPECIE SELVATICHE



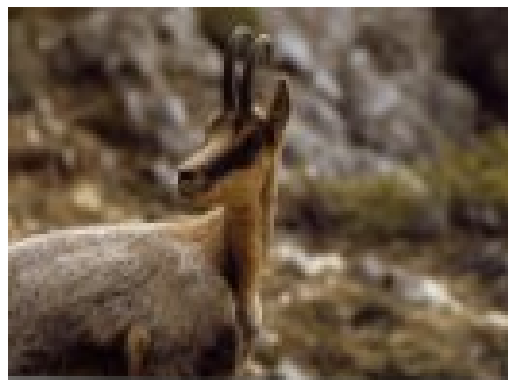
Ursus arctos



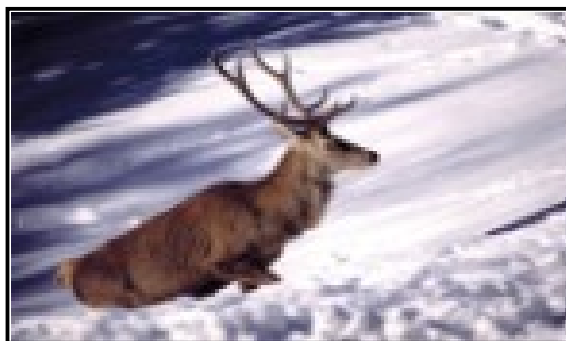
Capreolus capreolus



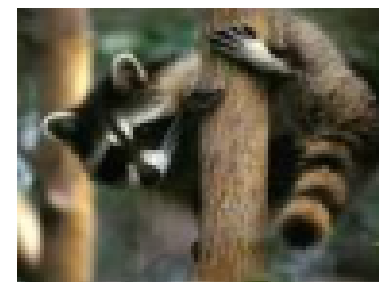
Gyps fulvus



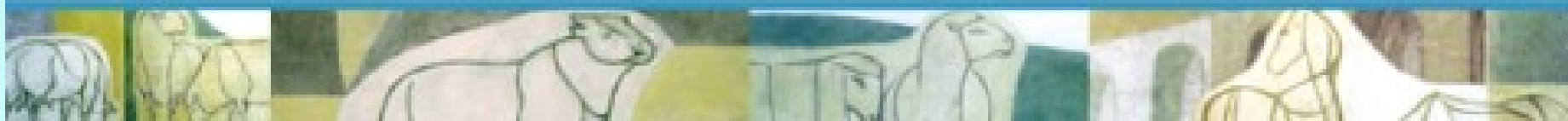
***Rupicapra
pyrenaica***



Cervus elaphus



Procyon lotor



TEST di PATERNITA'



Il test di paternità si basa sul principio che ogni individuo eredita il proprio patrimonio genetico dai genitori, il 50% dal padre ed il 50% dalla madre.

Consiste nel confrontare le caratteristiche genetiche del figlio oggetto con quelle del presunto padre e della madre. Il padre presunto, per essere considerato padre biologico, dovrà possedere metà del profilo genetico presente nel figlio/a.



That's **NOT** all Folks!

