

L'escena d'un crim



Fitxa estudiant

Aquests materials didàctics són per a ús docent i d'investigació. Resta prohibida la seva comercialització o modificació.

1. Cas pràctic. Identificació d'un sospitós amb l'anàlisi de mostres d'ADN

NOTA: Aquesta activitat és una adaptació del protocol del kit educatiu utilitzat en aquest taller: [TEST de CSI \(BIOTED\)](#).

Ahir al matí va aparèixer un cadàver en el jardí d'una casa d'una urbanització de Vilafranca del Penedès. El cos correspon al d'en Josep Oli, un empresari de renom i veí de la zona. En Josep Oli (63 anys) és un home casat amb la Carme Sabadell (49 anys) i sense fills. En aquest moment, el seu matrimoni no estava passant un bon moment, confirmat pel seu assistent personal, en Carles Torres (34 anys), amb qui mantenia una relació romàntica i tenien previst anar a viure junts, segons testimoni d'en Carles.

La policia científica, en una primera exploració de l'escena, ha determinat que es tracta d'una mort violenta provocada per una baralla. A pocs metres del cos, es va localitzar un canelobre amb taques sospitoses, que podria haver estat utilitzat com a arma homicida.

Encara queden pendents la inspecció completa de la casa, les entrevistes al cercle proper de la víctima i l'informe de l'autòpsia. Tot i això, les primeres hipòtesis apunten a un homicidi possiblement relacionat amb un intent de furt.

Durant la recollida d'indicis, els investigadors han localitzat diverses restes biològiques: petites mostres de sang trobades al canelobre i alguns cabells enganxats a la roba de la víctima. Aquest material ha estat enviat al laboratori forense per analitzar-ne l'origen i comprovar si pot ajudar a vincular alguna persona amb el crim.



2. Objectius

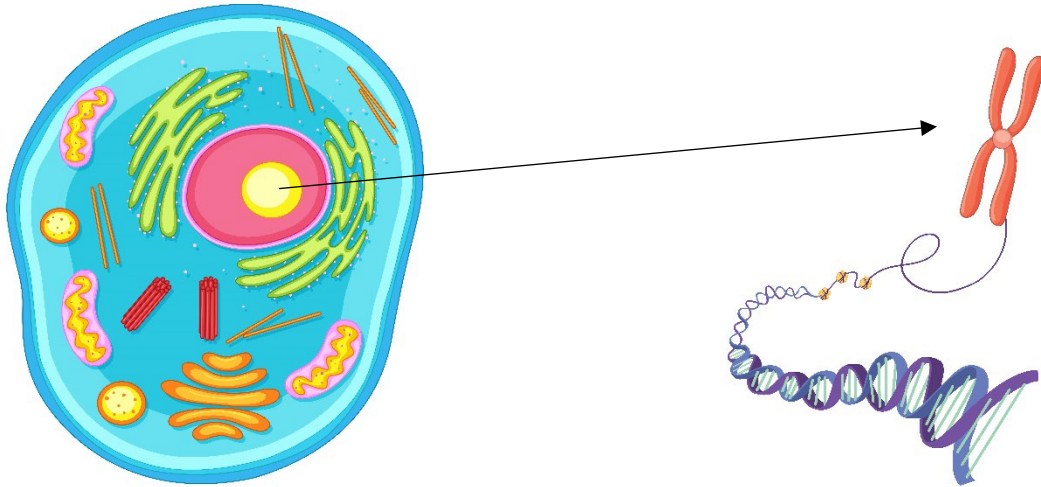
Els objectius d'aquesta pràctica són els següents:

- a) Familiaritzar-se amb el procés policial d'investigació forense al voltant d'un crim.
- b) Entendre què és l'empremta genètica i perquè serveix en l'escena d'un crim.
- c) Descobrir l'ús de la PCR en l'anàlisi forense.
- d) Aprendre a realitzar una electroforesi d'àcids nucleics en gel d'agarosa.
- e) Analitzar i comparar els patrons de bandes d'ADN (entre mostres obtingudes a l'escena del crim i l'ADN del cadàver i els possibles sospitosos).
- f) Interpretar els resultats i extreure conclusions (determinar quin dels sospitosos va estar a l'escena del crim i, per tant, serà imputat per la mort d'en Josep).



3. ADN: Què és? Com s'extreu? Polimorfismes i més!

L'ADN, present al nucli de totes les cèl·lules eucariotes, és el material genètic universal que codifica la informació necessària per al funcionament, el creixement i la reproducció cel·lular. Aquesta característica és comuna a totes les cèl·lules, ja que l'ADN actua com a base de la transmissió hereditària.



Les instruccions contingudes en l'ADN estan codificades en seqüències específiques de nucleòtids (adenina (A), timina (T), guanina (G) i citosina (C)) conegudes com a gens, que són traduïdes en proteïnes, les molècules que duen a terme la major part de les funcions biològiques i estructurals de l'organisme. El procés per passar d'ADN a ARN, així com el d'ARN a proteïnes és un procés altament regulat anomenat transcripció i traducció, respectivament.

No obstant això, en els mamífers, una gran proporció de l'ADN no codifica per a proteïnes (98%). Aquest ADN no codificant té rols importants en la regulació de l'expressió gènica, la compactació del cromosoma i la resposta cel·lular a l'entorn, malgrat que antigament es pensava que no tenia cap funció pel que també se'l coneixia com a "ADN brossa".

Aïllament d'àcids nucleics

L'aïllament d'àcids nucleics (llargues cadenes de nucleòtids com l'ADN) és el primer pas per poder-los estudiar i analitzar. En funció del teixit, organisme, o àcid nucleic que es vol purificar s'apliquen diferents protocols d'extracció, però tots segueixen els mateixos passos:

1. **Lisi del teixit i/o de les cèl·lules d'interès:** ús de forces mecàniques i addició de detergents, que permeten desestabilitzar les bicapes lipídiques de les membranes de la cèl·lula, incloent-hi la membrana plasmàtica i la nuclear.
 2. **Eliminació de les restes cel·lulars** (membranes, proteïnes, lípids i altres): la centrifugació permet que les restes cel·lulars es dipositin al fons del tub (pèl·let) mentre que els àcids nucleics romanen dissolts en la fase líquida (sobrenedant).
 3. **Purificació dels àcids nucleics:** els àcids nucleics es fan precipitar afegint-hi alcohol i sals. D'una banda, les càrregues positives de la sal s'uneixen als grups fosfat dels àcids nucleics i en neutralitzen la càrrega negativa, afavorint la seva estabilització i precipitació de la solució en afegir-hi etanol. Com més fred estigui l'alcohol, menor és la solubilitat dels àcids nucleics.
- **Quin tipus d'evidències es poden trobar en l'escena d'un crim per tal d'extreure material genètic com l'ADN? Trobarem el mateix ADN a qualsevol cèl·lula o teixit d'un mateix individu?**



Regions polimòrfiques i empremta genètica

L'**ADN polimòrfic** (poli = molts, morfo = forma) fa referència a les regions del cromosoma que presenten una elevada variabilitat entre individus, excepte en els bessons idèntics.

Hi ha dos tipus principals de regions variables:

Hi ha dos tipus principals de regions variables:

1. **STR** (Short Tandem Repeats, o **Repeticions curtes en tàndem**): regions del genoma que presenten moltes còpies repetides de la mateixa seqüència de nucleòtids, de només 2-4 parells de bases.
2. **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats o **Repeticions de nombre variable en tàndem**): regions del genoma que presenten seqüències de 15-70 parells de bases, repetides entre 5 i 100 vegades.

L'estudi de diverses regions polimòrfiques del genoma d'un individu permet determinar la seva **empremta genètica**, el que ens facilita la identificació de l'origen d'una mostra d'ADN. Així doncs, aquesta tècnica s'utilitza per establir relacions de paternitat i parentiu, identificar restes humanes i estudiar la base genètica de diverses malalties. A més a més, tenen una gran importància en la ciència forense, ja que permeten identificar amb precisió una persona comparant el seu ADN amb el d'una mostra recollida en una escena del crim.

La tècnica per a obtenir l'**empremta genètica** requereix de diversos passos. De manera simple, primer cal obtenir una mostra, assegurant-se que l'ADN no estigui malmès. A continuació, s'extreu l'ADN i se sotmet a una **PCR** i a una electroforesi en gel d'agarosa.

- Què determina que cada persona tingui un patró únic de bandes en l'ADN?

PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa

La **reacció en cadena de la polimerasa (PCR)** és un mètode *in vitro* per a sintetitzar enzimàticament seqüències específiques d'ADN.

Kary Mullis, qui va guanyar el Premi Nobel de Química (1993) per aquesta invenció, va escriure "A partir d'una sola molècula del material genètic, la PCR pot generar 100 mil milions de molècules similars en una tarda".

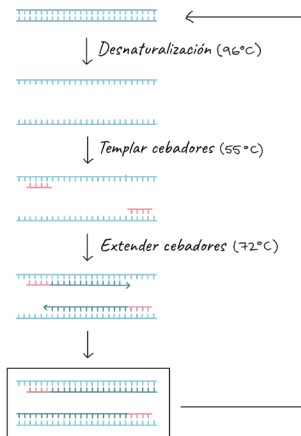
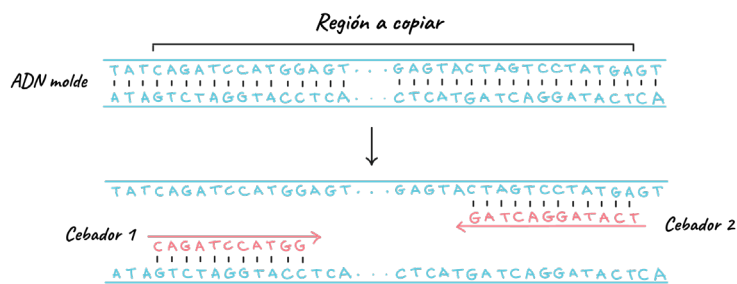
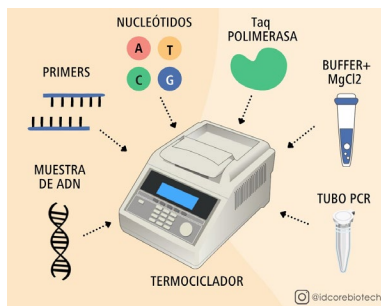
La PCR és una de les tècniques més importants de la biologia molecular i amb múltiples aplicacions en laboratoris d'investigació com poden ser la quantificació d'ADN, la clonació de gens, però també en d'altres àmbits com la detecció de malalties hereditàries (prova genètica) i en la medicina forense.

La PCR és una tècnica de fàcil execució, ja que només requereix: un tub d'assaig, l'**ADN d'interès** (també conegut com a "**motlle**"), uns reactius relativament simples (enzim anomenat **Taq polimerasa**, 2 oligonucleòtids sintètics coneguts com a **encebadors o primers**, i els **nucleòtids**) i una font de calor, proporcionada per un **termociclador**.

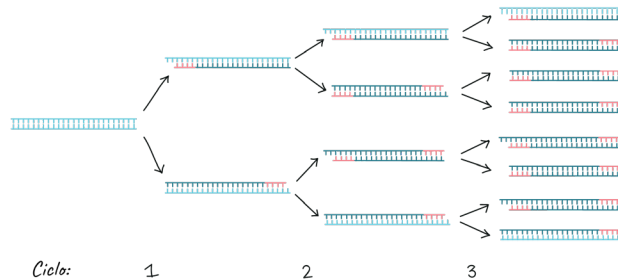
El procés d'amplificació per PCR consta de 3 passos principals:

1. **Desnaturalització** (94°): separació de les dues cadenes complementàries de l'ADN (aquella molècula que fa de "motlle").
2. **Aparellament** (~55°): hibridació o aparellament dels 2 encebadors a cadascun dels extrems de la cadena de l'ADN motlle.
3. **Extensió** (72°): síntesi de les noves cadenes d'ADN per allargament dels encebadors gràcies a l'acció de la Taq polimerasa, que afegeix nucleòtids de manera complementària a la cadena motlle.

Aquests tres passos conformen un **cicle**, que es repeteix unes 25-35 vegades, fent que el nombre de molècules es dupliqui a cada cicle seguint la fórmula **2ⁿ**, on 'n' correspon al cicle; per tant, la quantitat d'ADN augmenta exponencialment.



Repetir
25-35 X



Font: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

• Per a què serveix una PCR?

- **Per a fer una PCR, quina seqüència de nucleòtids cal conèixer (tota la seqüència del nostre interès o només els nucleòtids dels extrems)?**

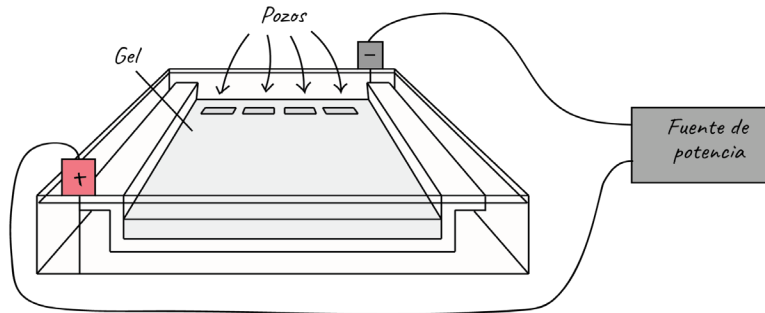
Electroforesis en gels d'agarosa

L'**electroforesi en gels d'agarosa** (un polímer aïllat d'algues) és el mètode més usat per a la separació, identificació i purificació de fragments d'àcids nucleics, com l'ADN.

Les mostres d'ADN, carregades negativament, es disposen en els pouets presents a l'extrem d'un gel, i gràcies a aplicar un camp elèctric, migraran cap a l'elèctrode positiu. Si aquesta migració es dona a través d'una matriu d'agarosa, i atès que totes les molècules d'ADN presenten la mateixa càrrega, aquestes es separaran segons el seu pes molecular; és a dir, els fragments més petits migraran més de pressa, mentre que els més grans avançaran més lentament. En funció de la mida concreta dels fragments d'ADN que cal separar, s'empraran gels amb diferent percentatge d'agarosa; els gels més densos resolen millor fragments de mida petita, i els menys densos els de mida gran.

Normalment, els gels d'agarosa es preparen i es fan córrer en un recipient anomenat **cubeta horitzontal**, submergits en una solució rica en sals (**tampó TBE**), que condueix eficaçment l'electricitat. A les mostres d'ADN, se'ls afegeix un **tampó de càrrega** que conté un agent espessidor per facilitar-ne la càrrega als "pouets" del gel i un colorant per visualitzar com avancen les mostres durant l'electroforesi.

Una vegada finalitzada l'electroforesi, caldrà visualitzar el gel emprant tincions o amb llum ultraviolada, per tal de veure en quina regió del gel es troben les diferents mostres d'ADN.



Font: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>

- Què ens permet l'electroforesi en gel d'agarosa?

- Per què cal carregar les mostres en el costat de l'elèctrode negatiu?

L'ús de la PCR i l'electroforesi d'agarosa en l'anàlisi forense

En anàlisi forense d'ADN de l'escena d'un crim, la PCR s'utilitza per amplificar i analitzar regions polimòrfiques de l'ADN (VNTR o STR), les quals varien entre individus. Per tal de visualitzar els fragments d'ADN amplificats, és necessari sotmetre'ls a una **electroforesi en gel d'agarosa**, una tècnica que permet separar les molècules segons la seva mida i així obtenir un patró característic per a cada individu.

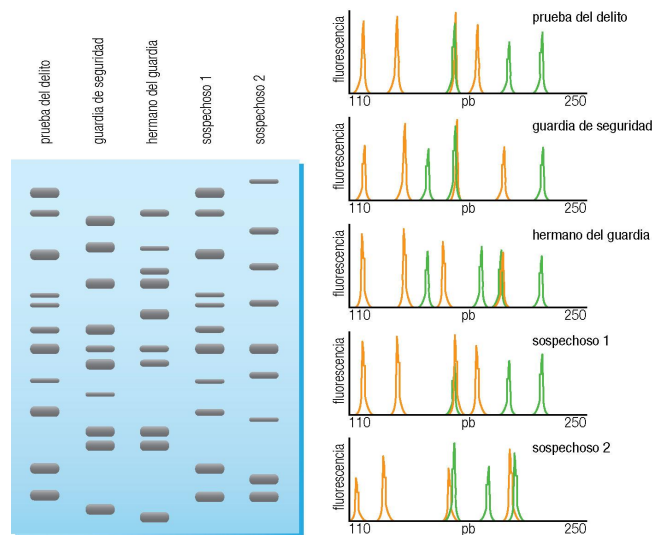
En aquest cas, per assegurar una major fiabilitat en la identificació i exclusió de sospitosos, en lloc d'analitzar només un marcador, es comparen múltiples marcadors entre l'ADN de la mostra trobada i el de les persones sospitoses per determinar possibles coincidències. De fet, en la pràctica real, l'FBI utilitza 13 marcadors diferents per garantir una probabilitat d'encert del 99,9%.

En aquesta pràctica, usarem la PCR i l'electroforesi en gel d'agarosa per identificar la persona culpable. Aquest mètode correspon al sistema tradicional, en què gairebé tot el procés és realitzat manualment per un/a tècnic/a de laboratori. Actualment, existeix un mètode més modern i automatitzat, en el qual un equip especialitzat duu a terme la PCR amb diferents encebadors fluorescents i, posteriorment, analitza les mostres mitjançant electroforesi capil·lar, permetent així una identificació més ràpida i precisa.

EXEMPLE: Ús de l'empremta genètica per a la investigació d'un delictes.

S'ha produït el robatori d'una obra d'art en un museu. Al trencar la vitrina, el lladre va deixar una taca de sang, a partir de la qual els investigadors han pogut aïllar ADN. La policia va interrogar el vigilant de seguretat, a un germà seu, i a dos delinqüents habituals, i va obtenir mostres d'ADN de tots ells.

SISTEMA TRADICIONAL vs. SISTEMA MODERN



Font: <https://www.bioted.es/protocolos/TEST-CSI.pdf>

Finalment, i gràcies a l'anàlisi forense de l'empremta genètica, es va poder identificar la probable persona autora del delictes, que va ser el _____. A més a més, és interessant observar com l'empremta genètica és més similar entre _____ que entre individus sense cap grau de _____.

4. Disseny de l'experiment

Aquest experiment introdueix l'ús de la PCR i l'electroforesi en gel d'agarosa com a mètode d'identificació d'un criminal en el camp de la medicina forense. En aquest cas, es simularà com a partir del material genètic obtingut d'una mostra biològica (sang o cabell) de l'escena del crim, es pot identificar un criminal mitjançant l'estudi de la seva empremta genètica.

En aquest experiment, s'analitzaran mostres d'ADN (representades amb diferents colorants) simulant l'anàlisi de dos VNTR. Concretament, s'analitzaran 4 mostres d'ADN obtingut de l'escena del crim i el de les dues persones sospitoses (Carme Sabadell i Carles Torres).

El patró d'ADN obtingut com a resultat de l'amplificació de la PCR (pas que no realitzarem a classe) serà senzill per a poder-lo analitzar directament en un gel d'electroforesi d'agarosa. L'objectiu de l'experiment és analitzar i comparar el patró de fragments d'ADN resultant per determinar si Carme Sabadell o Carles Torres va estar a l'escena del crim.

Per dur a terme aquest experiment, cal seguir els següents passos:

1. **Obtenir les mostres biològiques i extreure l'ADN.**
2. **Amplificar les regions polimòrfiques per PCR:** en aquest cas, s'usa la PCR per amplificar únicament 2 VNTRs.
3. **Electroforesi en gel d'agarosa:** separar els fragments d'ADN amplificats per PCR en un gel d'agarosa per observar els patrons de fragmentació.
4. **Anàlisi dels resultats:** comparar els patrons d'ADN obtinguts per determinar quina persona sospitosa presenta el mateix patró que l'ADN trobat a l'escena del crim.

SEGURETAT AL LABORATORI

- Cal portar guants i ulleres de protecció.
- Trebal·leu amb molta precaució amb els equips que impliquen l'ús conjunt de temperatura elevada i/o fusió de reactius.
- Vigileu en utilitzar qualsevol equip elèctric del laboratori.

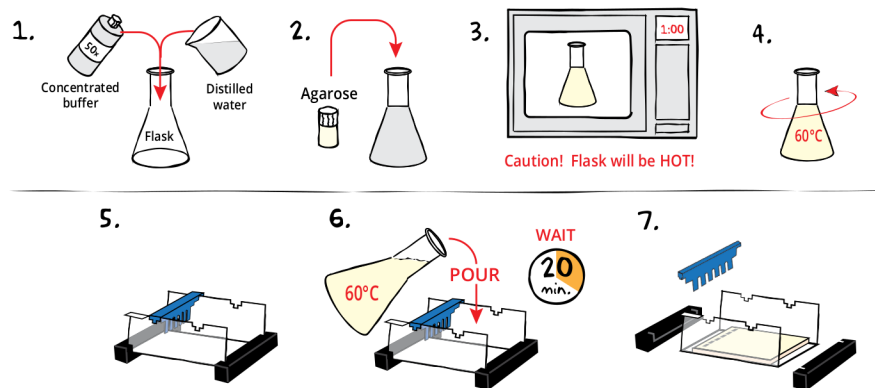
- Cal rentar-se sempre les mans amb sabó i aigua després de manipular reactius o materials biològics al laboratori.

És important documentar tot el que succeeix durant un experiment, incloent les condicions experimentals, els pensaments i les observacions, així com les dades recopilades i els resultats obtinguts.

- **Abans de començar l'experiment:** llegiu amb cura la introducció i el protocol. Utilitzeu aquesta informació per formar una hipòtesi per a aquest experiment.
- **Durant l'experiment:** enregistreu les vostres observacions i resultats.
- **Després de l'experiment:** Interpreteu els resultats i extraieu-ne les conclusions.

PART I: Preparació del gel d'agarosa

Per a poder fer una electroforesi, és necessari preparar prèviament el **gel d'agarosa**, per la qual cosa necessitarem també preparar el **tampó d'electroforesi**.



Font: KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis (Edvo-Kit#135), from EDVOT

1. DILUÏU el **tampó d'electroforesi** concentrat 10X amb aigua destil·lada (volem aconseguir una concentració final 1X).

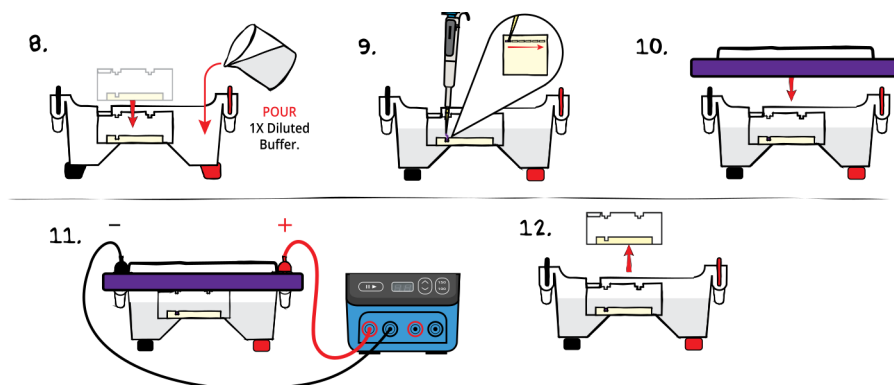
Volum total (mL)	Tampó concentrat 10X (mL)	Aigua destil·lada (mL)
500 mL		

2. Per obtenir **gel d'agarosa a l'1%** (1 g/100 mL), en un volum total de 45 mL, MESCLEU la pols d'agarosa amb la solució de tampó d'electroforesi 1X en un matràs d'Erlenmeyer de 250 mL.

Tampó d'electroforesi 1X (mL)	Massa d'agarosa (g)	Volum TOTAL (mL)
		45 mL

3. DISSOLEU la pols d'agarosa escalfant la solució al microones a potència màxima durant 1 minut. Amb cura, TRAEU el matràs d'Erlenmeyer del microones i remeneu. Continueu ESCALFANT la solució en intervals de 15 segons fins que l'agarosa estigui completament dissolta (la solució ha de ser clara com l'aigua, sense partícules).
4. REFREDEU l'agarosa fins uns 55 °C remenant amb cura per dissipar la calor uniformement. Si es produeix molta evaporació del líquid, afegiu més tampó d'electroforesi per evitar la pèrdua de volum total.
5. PREPAREU el motlle per a generar els gels. TANQUEU bé els extrems de la safata per col·locar el gel amb les capsas de goma, i COL·LOQUEU la pinta al lloc adequat per a formar els pouets, on es carregaran les mostres d'ADN.
6. BUIDEU la solució d'agarosa refredada a la safata preparada per col·locar el gel.
7. ESPEREU que el gel solidifiqui. En principi, en uns 20 minuts s'ha d'endurir completament, i es tornarà menys transparent a mesura que es solidifiqui. Quan el gel està solidificat i amb molta cura, TRAEU la pinta en direcció vertical, per evitar trencar cap pouet, així com els extrems del gel, però el NO TRAGUEU de la safata.

PART II: Electroforesi en gel d'agarosa



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

8. COL-LOQUEU el gel (encara a la safata) dins de la cambra d'electroforesi orientat correctament, és a dir, amb els pouets situats a prop del pol negatiu (color negre) i COBREIX el gel amb 300 mL Tampó d'Electroforesi 1X (preparat abans), assegurant que el gel estigui completament submergit i cobert pel tampó.

COMPROVACIÓ DE MOSTRES: Assegurar-se que tota la mostra estigui concentrada al fons dels microtubs abans de carregar el gel, sacsejant lleugerament aquests tubs ja que petites gotes poden quedar a les parets.

9. Després de posar una punta a la micropipeta, agafeu cada mostra (~20 µL), i CARREGUEU-LA al pou en l'ordre indicat a continuació:

Pouet #	Mostra	Descripció
Pouet 1	VERD	ADN d'un cabell de l'escena del crim
Pouet 2	VERMELL	ADN d'una taca de sang de l'escena del crim
Pouet 3	LILA	Mostra d'ADN de la Carme Sabadell
Pouet 4	BLAU	Mostra d'ADN de la Carme Sabadell
Pouet 5	GROC	Mostra d'ADN del Carles Torres
Pouet 6	BLANC	Mostra d'ADN del Carles Torres

10. COL-LOQUEU la coberta de seguretat a la unitat, situant els terminals dels elèctrodes en la posició corresponent, i COMPROVEU que el gel estigui orientat correctament.
11. CONNECTEU els cables a la font d'alimentació (el connector del cable negre a l'entrada de color negre de la font de corrent -negativa- i el connector del cable vermell, a l'entrada de color vermell de la font de corrent -positiva-). CONFIGUREU la font de corrent: VOLTATGE: 150V | TEMPS: ~ 20/30 minuts, i INICIEU l'electroforesi, vigilant que les mostres (colorant de seguiment) migrin, però NO arribin a sortir.
12. En finalitzar, APAGUEU la font de corrent i DESCONNECTEU els cables. Finalment, TRAIEU el gel i la safata de col·locació de l'electroforesi de la cambra, i dipositeu-lo sobre un transil·luminador de llum blanca, o una cartolina blanca, i n'observeu els resultats.

5. Resultats, anàlisi i conclusions

A continuació, completeu l'esquema del gel d'electroforesi amb els resultats observats:



Carril	Descripció
1	
2	
3	
4	
5	
6	

- **Quin és la persona sospitosa que ha estat a l'escena del crim i, possiblement, hagi estat la que hagi comès el crim?**

- **Com heu estat capaços de determinar qui, presumptament, ha comès el crim?**

- **Què pensaríeu si dos individus presentessin un mateix patró de bandes d'ADN?**