

La scoperta del DNA

Una rivoluzione scientifica “silenziosa”

Più di mezzo secolo fa, il 25 aprile 1953 appare un breve articolo di 900 parole sulla rivista scientifica *Nature*. L'argomento trattato è la scoperta della struttura a doppia elica della molecola di **DNA**, molecola che contiene l'informazione genetica e che ha una conformazione tridimensionale. Vedremo perché questa scoperta viene oggi riconosciuta come basilare per la scienza, ma prima conosciamo meglio la storia dei “nostri scienziati” e l'ambiente scientifico in cui lavorano. Gli autori dell'articolo si chiamano **James Watson** e **Francis Crick**: sono due giovani e intraprendenti ricercatori inglesi che lavorano insieme in un laboratorio della prestigiosa università di Cambridge, *J. Watson* ha 24 anni ed è un ragazzo vivace e geniale mentre *F. Crick* ha 36 anni con un passato di fisico presso l'università. La scoperta della natura tridimensionale della molecole di DNA avviene a febbraio, due mesi prima della sua rivelazione pubblica, ma al momento non desta particolare interesse da parte della comunità scientifica di biochimici. Apparentemente non viene considerata fondamentale dato che in quel periodo ancora non si attribuisce molta importanza al DNA. Molti scienziati degli anni '50 ritengono che il DNA sia solo una molecola accessoria rispetto ai meccanismi della vita e riconoscono invece un ruolo fondamentale alle proteine. In effetti solo in seguito si è scoperto che l'informazione genetica è contenuta e trasmessa grazie al DNA che permette di costruire le proteine e che le proteine non contengono informazioni per fare altre proteine. Quindi in un primo momento, solo pochi ricercatori dell'ambiente in cui lavorano *J. Watson* e *F. Crick*, capiscono e arricchiscono la scoperta epocale che i due hanno rivelato con una sola paginetta e una foto. Infatti anche la nascita stessa del rivoluzionario articolo pare abbia avuto un inizio “casalingo”. Odile, la moglie di Crick, ha costruito il famoso modellino tridimensionale composto di palline e bastoncini del DNA che compare nella foto insieme ai due ricercatori che lo osservano. Mentre Elizabeth, la sorella minore di Watson, ha rinunciato a un sabato pomeriggio di svago per scrivere a macchina le 900 parole dettate dai due scienziati da mandare a *Nature*.

J. Watson e *F. Crick* sono stati in grado di rivelare per primi la struttura spaziale del DNA sia grazie ad un intuitivo e proficuo lavoro di lettura e rielaborazione di molti studi compiuti prima del 1953 da diversi scienziati, sia per merito indiretto di un'altra ricercatrice che, parallelamente a loro è stata in grado di fotografare ai raggi X la struttura del DNA. Questa fondamentale foto, scattata da Rosalind Franklin, viene loro mostrata da un professore all'insaputa dell'autrice. *J. Watson* e *F. Crick* analizzano l'immagine e intuiscono quello che la Franklin ha esitato a ipotizzare, cioè che la molecola di DNA ha una struttura tridimensionale. Questa scoperta appunto, si è poi dimostrata a distanza d'anni, la più importante folgorazione nel campo delle Scienze della Vita degli ultimi 50 anni, dato che da essa in poi è stato possibile capire come funziona la trasmissione genetica di generazione in generazione.

Oggi possiamo definire la struttura del DNA come una **doppia elica** composta da due filamenti avvolti in modo simile ai montanti di una scala a chiocciola, i gradini della lunga scaletta sono formati da dei legami fra molecole di idrogeno che legano i **nucleotidi**. Che cosa sono i nucleotidi? Sono i mattoncini fondamentali del DNA, ognuno di essi è composto da una molecola di acido fosforico, da uno zucchero chiamato desossiribosio e da una base azotata. Le basi azotate sono di quattro tipi diversi: **adenina** (A), **guanina** (G), **timina** (T) e **citosina** (C). Le basi azotate che compongono il DNA si combinano tra loro a due a due in una maniera precisa che si ripete. Negli anni '50 tutto questo non è stato ancora compreso e spiegato, vediamo quindi come si è arrivati a quello che sappiamo oggi, conoscendo gli studiosi che l'hanno scoperto e le tappe della loro ricerca.

Gli scienziati e le tappe

Perché la scoperta del 1953 diventa così fondamentale per la comprensione delle basi genetiche della vita e dell'evoluzione dell'uomo e degli esseri viventi? Per comprendere l'importanza della doppia elica del DNA è opportuno ripercorrere le tappe principali degli studi sul DNA che si sono succedute prima e dopo la pubblicazione del primo lavoro di *J. Watson* e *F. Crick* su *Nature*. La prima notizia che si ha dell'esistenza del DNA risale al 1869, **F. Miescher** cita una

sostanza acida che chiama nucleina, essa è contenuta nel nucleo delle cellule ed è composta da proteina e acido nucleico che verrà poi ribattezzato DNA. Da allora sono proseguiti molti studi sull'argomento fino ad arrivare al 1938. Gli **scienziati R. Signor, T. Caspersson e E. Hammarsten** capiscono che la molecola di DNA è formata da lunghe catene (sequenze) di basi nucleotidiche. Le basi nucleotidiche (o nucleotidi) sono, come abbiamo già visto, 4 mattoncini diversi che costituiscono la lunga molecola acida di DNA, si chiamano: adenina, timina, guanina e citosina. Nel 1944 altri ricercatori universitari ipotizzano per la prima volta che la molecola di DNA contiene l'informazione genetica.

L'informazione genetica (l'insieme d'istruzioni che servono alle cellule per costruire le proteine) sarebbe codificata nelle varie sequenze di basi nucleotidiche che si ripetono nella catena del DNA. Quindi viene intuito che nel DNA, che viene trasmesso attraverso le generazioni dai genitori ai figli, risiede l'informazione genetica che ogni cellula del nostro corpo necessita per svolgere la sua precisa funzione. Finalmente nel 1952, **A. Hershey e M. Chase**, stabiliscono che esclusivamente le molecole di DNA possono essere geneticamente trasmesse alla generazione successiva e non le proteine. Sempre nello stesso anno la scienziata **R. Franklin** insieme al collega **R. Gosling** (amico di J. Watson e F. Crick) producono una mappa molto definita e chiara della diffrazione a **raggi X** ottenuta dall'irraggiamento della molecola di DNA. Si tratta proprio della famosa foto che ha ispirato l'intuizione del 1953 sulla natura a tre dimensioni della forma del DNA.

Nel 1958 avviene una svolta, **M. Meselson e F. Stahl** comprendono e illustrano il meccanismo attraverso il quale il DNA si riproduce: la doppia elica si srotola, si apre e si ottengono due lunghe catene parallele. Ogni filamento viene ricopiato e in questo modo si ottengono due copie identiche di molecole di DNA a quella originaria che non esiste più. Solo ora in realtà, diventa molto importante la scoperta del 1953 sulla struttura tridimensionale del DNA, in quanto sapere esattamente com'è fatta la molecola nelle tre dimensioni aiuta a capire come si replica (con il meccanismo ora chiarito della separazione delle due catene) formando poi altre doppie eliche che si avvolgono e risultano complete e uguali a quella originaria. Da adesso in poi le ricerche continuano freneticamente, nel 1959 viene scoperto che i filamenti vengono copiati e replicati da un enzima presente nelle cellule del nostro corpo chiamato DNA polimerasi. Ecco svelato maggiormente il meccanismo della trasmissione genetica, fino ad arrivare nel 1961 a capire che determinate molecole di DNA possono dirigere e istruire la costruzione cioè la sintesi di determinate proteine.

Anche se ora è chiaro che tutte queste importanti scoperte sono il frutto del lavoro di tanti ricercatori, non va tolto certo il merito a coloro i quali per primi hanno avuto una delle intuizioni fondamentali di questa lunga strada di conoscenza che prosegue ancora oggi. Infatti nel 1962, James Watson, Francis Crick e Maurice Wilkins ricevono il premio Nobel per le loro scoperte sul DNA.

La scoperta del metodo PCR

Tutti conoscono il romanzo o hanno visto il film Jurassic Park nel quale, grazie a metodi di laboratorio, il sangue di un dinosauro conservato nell'apparato buccale di una zanzara imprigionata nell'ambra, è estratto e quindi diventa possibile replicare il DNA dell'animale ormai estinto. Gli scienziati che lavorano dentro lo Jurassic Park hanno usato la metodica **PCR** per far nascere dei dinosauri ormai scomparsi da millenni, da uova prodotte ai giorni nostri grazie al DNA trovato nella zanzara! Ma come è stato possibile?

Siamo circa all'inizio degli anni '80 e nel mondo delle scienze biologiche si svolge un'altra potente rivoluzione.

L'ambientazione è sempre quella del laboratorio di biochimica, biologia molecolare o di microbiologia e il protagonista del nostro interesse è sempre la molecola di DNA. Poche invenzioni hanno rivoluzionato in maniera così notevole e repentina il corso della biologia molecolare come la **PCR**, acronimo di **Polymerase Chain Reaction**, in italiano reazione di polimerizzazione a catena. La reazione di polimerizzazione a catena del DNA è una tecnica di biologia molecolare che permette di moltiplicare cioè copiare (tecnicamente "amplificare") una determinata catena di DNA. Per una determinata catena di DNA s'intende un frammento d'acido nucleico di cui conosciamo le sequenze nucleotidiche (serie di mattoncini diversi che compongono il filamento di DNA) iniziali e terminali, cioè l'inizio e la fine del frammento. Questo processo di replicazione avviene normalmente in natura, nelle cellule del nostro corpo, quando il DNA contenuto nel nucleo, si svolge dalla sua conformazione a doppia elica e i suoi filamenti vengono copiati dall'enzima DNA polimerasi. Questa normale

fase della riproduzione cellulare viene imitato dalla tecnica PCR in una provetta. In pratica viene ricostruito un pezzetto di DNA "completo" a doppia elica da un filamento a singola elica. La rivoluzione sta proprio nel fatto che usando questo metodo di laboratorio, l'uomo può decidere di prendere un certo tratto di DNA che gli interessa per studiarlo e utilizzarlo secondo lo scopo della ricerca, fuori dei meccanismi cellulari che avvengono in un corpo vivente.

L'utilizzo della metodica PCR permette quindi di "amplificare" un determinato tratto di DNA, moltiplicandolo ovvero replicandolo, per miliardi di volte in un tempo molto breve, poco più di un ora e ottenendone così tantissime copie. La tecnica di laboratorio, prodotta nella prima metà degli anni '80 dalla mente brillante del Dr. **Kary B. Mullis**, ha permesso di comprendere molto meglio l'informazione genetica contenuta nel DNA di ciascun individuo, con conseguenze fondamentali, in campi diversissimi, dai laboratori dove si fa ricerca pura, ai laboratori d'analisi degli ospedali, fino alle aule dei tribunali. A conferma dell'importanza di quest'idea, Kary B. Mullis ha ricevuto nel 1993 il premio Nobel per la chimica.

Prima di capire come funziona una "reazione" (così si chiama la procedura che avviene in una provetta) di PCR applicata ad un certo tratto di DNA, vediamo qualche notizia sulla vita e la personalità del suo inventore, un simpatico genio dei nostri tempi.

Il genio spiritoso

Kary B. Mullis

Fin dal periodo in cui frequenta la *Dreher High School* di Columbia (USA), il Dr. Mullis si rivela subito un giovane sfrontato e dotato di uno spiccato senso dell'umorismo, diventando un leader degli studenti. Negli anni successivi accumula titoli accademici e importanti incarichi, si occupa di pediatria, biochimica, cardiologia. Nel 1979 lavora alla *Cetus Corporation di Emeryville*, California come chimico particolarmente esperto di DNA, si dedica alla ricerca sulla sintesi degli oligonucleotidi cioè dei mattoncini che compongono il DNA e inventa la reazione a catena della polimerasi (PCR).

La vera intuizione su come moltiplicare il DNA per miliardi di volte arriva nel 1983. La leggenda racconta che il Dr. Mullis sta tornando a casa una sera come tante dal laboratorio, la sua mente è persa in vaghi pensieri, ma all'improvviso nota che il vialetto sul quale cammina è formato da tanti settori disposti come i gradini di una scala uno dietro l'altro. Continua a camminare e il vialetto si divide, arriva ad un bivio. Questo gli ricorda i due filamenti di DNA che si dividono per poi replicarsi e all'improvviso, i lampioni che costeggiano il vialetto si accendono uno dopo l'altro perché ormai è buio. La folgorazione arriva in un secondo: gli viene in mente un modo per fare infinite copie di filamenti di DNA da un singolo tratto, torna indietro e corre sul vialetto illuminato verso il laboratorio per cercare subito di realizzare la sua idea geniale. La carriera del Dr. Mullis prosegue brillantemente, riceve il **Nobel** ed anche un altro premio molto prestigioso, il **Japan Prize**. Lavora a ricerche tecnologiche e di fotochimica del DNA. In uno dei suoi libri più riusciti "Ballando nudi nel campo della mente" del 2000, si può apprezzare il suo umorismo e la sua genialità che esprime nei settori più diversi: scrive di ragni velenosi, di scienza e di parapsicologia, d'astrologia e del virus Hiv.

Dentro la provetta

Come funziona una PCR?

Il Dr. Mullis, avvalendosi delle sue vaste conoscenze sul DNA e di tutte le attrezzature di laboratorio disponibili negli anni '80, inizia a svolgere gli esperimenti per realizzare l'idea geniale che ha avuto sul vialetto quella sera. Il suo scopo è definire un metodo che partendo da un tratto di DNA, gli permetta di copiarlo tante volte "in vitro" cioè in una provetta. Il principio teorico del funzionamento del metodo PCR si può raccontare come ora vedremo.

Con un po' di fantasia paragoniamo l'esecuzione d'esperimento di PCR in laboratorio alla preparazione di una torta in cucina. Per iniziare a preparare la torta disponiamo gli ingredienti necessari sul tavolo (uova, latte, burro, lievito, farina, etc.) e poi li mescoliamo in una terrina. Nel caso dell'allestimento di una reazione di PCR disponiamo sul bancone da laboratorio vari componenti biologici e chimici (gli ingredienti della torta) contenuti in appositi contenitori come provette, pipette e vasetti. Bisogna eseguire dei passaggi preliminari alla preparazione della torta come dividere il tuorlo

dall'albume dell'uovo, o lavorare il burro troppo freddo. Nel caso della PCR vanno eseguiti alcuni passaggi prima di mischiare tutto in un'unica provetta finale (la terrina per fare l'impasto).

Estrazione del DNA

Prima di tutto dobbiamo estrarre il DNA dal nucleo della cellula in cui è contenuto. Per esempio bisogna far uscire il DNA da cellule batteriche o ematiche oppure da dei resti di una mummia umana o animale. Si procede quindi eseguendo vari passaggi con alcuni composti chimici e sottoponendo il campione cellulare a trattamenti adatti al tipo di campione stesso. In sostanza dobbiamo demolire la struttura cellulare, vale a dire rompere tutte le cellule del campione in modo da favorire la fuoriuscita del DNA. Poi è necessario digerire le proteine che sono associate alle molecole di DNA, questo vuol dire che alla fine del procedimento si ottiene una soluzione che contiene solo il DNA che è stato separato dalle proteine digerite, le quali si sono trasformate in aminoacidi (i mattoncini che costituiscono le proteine). Alla fine di questo passaggio iniziale avremo una provetta in cui è disciolto il DNA in un liquido per esempio l'etanolo, in questo ambiente il DNA non è solubile quindi i suoi filamenti sono visibili in sospensione nella provetta.

I componenti della reazione PCR

Essi sono gli ingredienti della torta ancora non mischiati. Sul tavolo da laboratorio abbiamo il DNA estratto contenente la sequenza precisa che si vuole copiare tante volte viene chiamato target e l'obiettivo dell'esperimento è moltiplicare questo specifico pezzetto. Quindi d'ora in poi usiamo la "convenzione" di chiamare la sequenza di DNA che si vuole copiare "target", in modo da non confonderla con altri tratti di DNA che partecipano alla PCR.

Inoltre servono due ulteriori tratti di DNA che si chiamano **primers**, il loro scopo è di funzionare da iniziatori della copiatura e replicazione del DNA target, cioè aiutano e innescano l'inizio della replicazione. Durante la reazione di PCR, il filamento target viene sottoposto a calore quindi la sua doppia elica si apre: si ottengono così due catenelle divise che prima formavano il DNA target. Qui intervengono i primers che si accoppiano, in pratica si dispongono vicino ad ogni catenella singola di DNA target. Ora inizia la copiatura del DNA.

Perché avvenga la replicazione del target abbiamo bisogno anche di un altro ingrediente, la DNA polimerasi, come abbiamo già visto è un enzima cellulare. La DNA polimerasi ha anche la funzione di replicare e riparare il DNA. La polimerasi è in grado di allungare un filamento iniziatore (**primer**) aggiungendo uno per volta dei nucleotidi che sono i mattoncini che compongono le catene di DNA.

Nella ricetta bisogna ancora aggiungere una miscela di piccoli mattoncini liberi, unità base delle catene di DNA, i nucleotidi che servono per costituire i nuovi filamenti di DNA. Abbiamo già descritto cosa sono i nucleotidi al punto 1. Manca solo un miscuglio di altri elementi di supporto (come potrebbero essere il sale o la scorza di limone grattugiata nella torta) come per esempio magnesio che serve a creare l'ambiente chimico giusto perché avvenga la reazione.

Il termociclatore

Si tratta del forno per cuocere la torta. Abbiamo tutto quello che serve e quindi mischiamo tutti gli ingredienti in un'unica provetta che corrisponde al versare la miscela per la torta in una teglia. Per cucinare una torta mettiamo la teglia nel forno e facciamo cuocere per un determinato tempo ad una certa temperatura, in questo caso mettiamo la provetta che contiene tutti i composti in un termociclatore. Si tratta di uno strumento da laboratorio che ha un termostato: possiamo quindi regolare e programmare le variazioni di temperatura e i tempi applicati a ciascuna delle tre fasi dell'amplificazione cioè i tre passaggi che ora vedremo necessari per copiare tante volte il DNA target (la cottura del dolce). Il funzionamento del termociclatore si basa su differenti sistemi di riscaldamento e raffreddamento attraverso aria, liquidi, resistenze elettriche etc. Il termociclatore ha un cassetto in cui vengono inserite le provette in cui avviene la reazione PCR, ne esistono in commercio di diversi tipi di varie grandezze per tutte le esigenze di laboratorio.

Le tre fasi della PCR

Finalmente si cuoce la torta, prendiamo la provetta e la inseriamo nel termociclatore, che cosa succede adesso? La cottura consiste nel sottoporre la provetta ad un certo numero di cicli di variazioni termiche. Ogni ciclo termico è composto di tre fasi. Si alternano momenti di riscaldamento delle provette a fasi di raffreddamento.

1° fase: denaturazione

In questo primo passaggio della reazione PCR, avviene la totale separazione dei due filamenti della catena di DNA target da replicare. Solitamente la temperatura applicata alla provetta deve raggiungere i 94°C per 30-60 secondi. Scaldando il DNA avviene lo srotolamento della doppia elica e l'allontanamento dei due filamenti, si dice che il DNA si denatura.

2°fase: ibridazione dei primers

Si tratta del momento più delicato in cui i primers devono "ibridare stabilmente" al DNA stampo. Che cosa significa? Vuol dire che i filamenti primers che abbiamo aggiunto nella miscela devono accoppiarsi con i filamenti singoli e divisi dell'originario DNA target. Solitamente si procede per tentativi sperimentali con lo scopo di trovare la temperatura ideale per favorire l'accoppiamento "catenelle - primers con catenelle - target" a seconda del tipo di campione di DNA che si vuole replicare. Di solito la temperatura viene abbassata fino a circa 30 - 55 °C.

3°fase: estensione delle nuove catene di DNA

La temperatura ottimale per la polimerizzazione cioè la costruzione di filamenti di DNA identici a quelli del DNA target dipende dall'enzima DNA polimerasi utilizzato. Attualmente si usa un enzima che si chiama Taq polimerasi e si applicano generalmente 65 - 72°C per 5 minuti. In questa fase l'enzima polimerasi attacca, appiccica fisicamente i mattoncini base della catena (i nucleotidi) ai filamenti primers che sono appaiati e complementari ai filamenti target. In pratica avviene la copiatura d'ogni singolo filamento target. La DNA polimerasi attua la correzione d'errori nel caso si verifichi l'incorporamento di un nucleotide "sbagliato", eventualità che può accadere dato che il meccanismo non è mai perfetto. Quindi la DNA polimerasi è in grado di eliminare l'errore e di creare un corretto appaiamento con il corrispondente nucleotide presente sul filamento che viene copiato e replicato.

Durante il primo ciclo della reazione PCR vengono sintetizzati nuovi filamenti, che dopo denaturazione cioè divisione della doppia elica e allontanamento delle catenelle parallele, possono accoppiarsi con i primers. Questi prodotti si accumulano aritmeticamente, ma è solo dal secondo ciclo di reazione che si formano due prodotti a singola elica, che costituiranno un tratto identico al DNA a doppia elica target.

Quindi attraverso ripetuti cicli di denaturazione, ibridazione dei primers ed estensione degli stessi si ottiene un accumulo esponenziale del segmento bersaglio di DNA target.

Durante ogni ciclo di "cottura" il numero dei frammenti di DNA che si vogliono copiare (cioè quelli posti fra i due primers) raddoppia. Dopo solo 32 cicli ripetuti si sono già formati milioni di copie di frammenti di DNA a doppia elica uguali al DNA target .

A questo punto la torta è pronta e la possiamo togliere dal forno, il dolce sarà lievitato e cotto, pronto per essere assaggiato. Allo stesso modo la provetta tolta dal termociclatore, al termine di tutti i cicli termici di "cottura" e raffreddamento a cui è stata sottoposta, è pronta, la metodica PCR è terminata. Le numerosissime copie di DNA, uguali a quelle della sequenza originaria che abbiamo voluto replicare, sono disponibili per essere in seguito analizzate e utilizzate in vari modi secondo lo scopo dell'esperimento.

Le DNA polimerasi termostabili

Il Dr Mullis comprende che un limite determinante nella riuscita della reazione d'amplificazione è la distruzione tramite il calore dell'enzima DNA polimerasi che deve essere continuamente aggiunto durante ciascun ciclo del processo dato che non resiste alle alte temperature dei cicli di PCR . Infatti quando lui comincia gli esperimenti di PCR negli anni '80, usa la DNA polimerasi estratta dal microrganismo *E. coli*, questo enzima però è tremolabile e viene distrutto a 94°C.

Un'altra rivoluzione avviene quindi alcuni anni dopo, con la scoperta del microrganismo termofilo *Thermus aquaticus*, il quale è in grado di vivere addirittura in sorgenti di acqua bollente. La polimerasi termoresistente di questi batteri, chiamata appunto **Taq polimerasi**, rimane attiva anche 94° C: basta quindi aggiungerla una volta sola, all'inizio della reazione.

Ora, in tutti i laboratori in cui vengono eseguite delle analisi di PCR su campioni di DNA, si usano degli enzimi DNA polimerasi termostabili.

La DNA polimerasi, isolata appunto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, scoperto dalle sorgenti calde del Parco di

Yellowstone, oggi viene prodotta attraverso la tecnica del DNA ricombinante in *E. coli*. In pratica si usano i batteri *E. coli* come produttori d'enzima Taq polimerasi grazie a manipolazioni genetiche che inducono *E. coli* a fabbricare l'enzima uguale a quello che *Thermus aquaticus* produce alle sue condizioni di vita estreme.

A cosa serve la PCR?

Dalla teoria alla pratica

In soli 20 anni dalla sua invenzione, la tecnica PCR, grazie alla tecnologia e alla ricerca che hanno fatto molti progressi, ora viene usata per risolvere quesiti che prima non trovavano risposta.

Data la sua estrema sensibilità, la PCR trova attualmente applicazione ovunque si maneggino quantità molto piccole di DNA. Nel campo delle diagnosi mediche, la quantità di DNA contenuta in una goccia di sangue è più che sufficiente per amplificare e verificare l'eventuale presenza di una mutazione genetica associata ad una malattia ereditaria. Con questa metodica si cercano cellule tumorali, per esempio nel caso di tumori liquidi che sono molto difficili da individuare. Inoltre, poiché il DNA è un materiale molto stabile, persino dopo un migliaio d'anni, come nel caso delle mummie egizie, è possibile studiarlo mediante PCR. Grazie alla scoperta della metodica PCR, è nata una nuova disciplina scientifica: la paleobiologia che si occupa dello studio del DNA di piante e animali fossili.

Insomma anche solo accennare a tutte le possibili varianti della metodica PCR e i rispettivi campi d'applicazione sarebbe impossibile, in quest'occasione quindi consideriamo solo alcuni esempi.

Un aiuto nelle indagini di Polizia e Carabinieri

Anche nelle aule dei tribunali ora è normale parlare di analisi del DNA tramite il metodo PCR. In medicina forense, il rinvenimento sul luogo di un delitto o di un incidente di materiale organico (come capelli, frammenti di pelle o sangue) permette l'identificazione della vittima o il riconoscimento del colpevole.

Nel Laboratorio d'Indagini Biologiche del Servizio Polizia Scientifica di Roma, i ricercatori hanno messo a punto una metodica PCR adatta a risolvere anche quei casi di delitti che apparentemente si presentano senza tracce lasciate sul luogo del misfatto. La possibilità, da parte della Polizia Scientifica, di trovare delle indicazioni su come si sono svolti fatti misteriosi e sull'identità dei colpevoli, sono molto aumentate da quando è più facile analizzare il DNA. Inoltre si sta lavorando per istituire una Banca dati del DNA italiana in cui siano conservati i profili di DNA completi di soggetti pericolosi o indagati. Circa dal 1996, l'applicazione della tecnica PCR permette l'analisi del DNA anche in quei casi in cui i campioni sono molto scarsi o rovinati come capelli incompleti o materiale osseo di vecchia data.

Le varie serie televisive americane ed ultimamente anche italiane, rappresentano spesso interesse squadre di biologi, biochimici e scienziati vari che svolgono indagini a fianco degli investigatori molto lontane dalla realtà. Ormai è normale vedere sul luogo del delitto, gli esperti biologi in tuta bianca e mascherina che raschiano muri, prelevano campioni biologici dallo spazzolino da denti o scovano tracce di sangue o sperma nascoste e invisibili.

Scoprire microrganismi ancora sconosciuti

Anche dal punto di vista ambientale, viene applicata la PCR per cercare microbi indesiderati nelle acque potabili oltre che nei fiumi e nelle acque marine.

Per monitorare e identificare una comunità microbica bisogna prelevare dei campioni di microrganismi di cui non si conoscono ancora il genere e le specie di appartenenza dal loro ambiente naturale e cercare di coltivarli in laboratorio. Per conoscere i batteri prelevati, l'utilizzo di diverse metodiche PCR può essere davvero risolutivo perché permette di identificare con certezza il loro DNA.

Il vantaggio di utilizzare metodi che analizzino e riconoscano il DNA dei batteri, è che i tempi degli esperimenti sono molto più brevi che usando tecniche di microbiologia classica, inoltre i risultati sono più precisi e ripetibili. Infatti sono stati scoperti e studiati con tempi accettabili e risultati affidabili, molti gruppi di microrganismi che popolano gli ambienti più diversi tra loro: le acque marine in cui è presente del petrolio o altri idrocarburi che vengono metabolizzati (mangiati) da certe specie di batteri; terreni inquinati da reflui (liquami di animali) zootecnici; latte; formaggi e ambienti naturali in cui i prodotti alimentari vengono fatti stagionare.

Il DNA nel piatto

Nelle industrie alimentari, per preparare svariati prodotti a base di carne, si usa miscelare diverse specie animali, questa pratica è consentita purché le differenti specie d'appartenenza siano indicate negli ingredienti. Quindi nell'etichetta di un salame deve essere chiaramente scritto, in ordine decrescente di quantità, quali specie animali sono state usate.

La determinazione delle specie animali presenti in un alimento si esegue durante il lavoro di controllo degli alimenti da parte della Polizia Veterinaria che ha il compito di svolgere analisi biologiche e chimiche con lo scopo di tutelare i diritti dei consumatori.

Una precisa definizione delle specie è di rilevante importanza anche rispetto alle scelte del consumatore che può manifestare l'esigenza di conoscere le specie animali o vegetali presenti in un alimento per questioni sanitarie, nel caso d'allergie specifiche nei confronti d'alcune carni o che desideri attenersi a limitazioni alimentari per motivi religiosi. Alcune religioni vietano il consumo di carne di maiale o d'altri ingredienti in certi periodi dell'anno, quindi chi vuole attenersi a queste regole ha il diritto di essere tutelato fidandosi di quanto scritto in etichetta.

Le frodi alimentari riguardano quasi tutte le attività produttive, dalla vendita di prodotti ittici, alla preparazione di carni in scatola. Più spesso di quanto si crede alcuni pesci più pregiati e costosi, vengono sostituiti con altre specie molto simili, ma di minor valore, per esempio piccoli squali vengono spacciati per palombi oppure le carni di granchio e d'aragosta sono sostituite con prodotti simili ma più poveri.

Il riconoscimento macroscopico cioè visivo di carni simili nel colore e nella forma, quando queste sono congelate, è oltremodo difficoltoso. La stessa inaffidabilità nell'identificazione, si verifica anche con le carni fresche di alcune specie. Quando vengono eseguiti dei controlli da parte dei Veterinari o dei Carabinieri, in un macello o un mercato del pesce od anche in un magazzino di sementi, non è facile dire "a occhio" se un prodotto è a posto e regolare.

Le analisi del DNA delle specie animali e vegetali con l'utilizzo della PCR hanno molto facilitato e sveltito le procedure di controllo sugli alimenti sospetti da parte delle Autorità. Per esempio, il controllo degli alimenti per quanto riguarda la ricerca di OGM (nel riso, pasta o verdure), viene ormai eseguito con tecniche di PCR in tutti i laboratori di analisi.

In questi ultimi anni dunque, si stanno velocemente sviluppando delle metodiche che prevedono l'uso della PCR. Il principale vantaggio di utilizzare la PCR è rappresentato dalla possibilità di copiare frammenti di DNA bersaglio (target) di poche paia di basi, cioè molto corti. In campo alimentare, questa capacità di evidenziare DNA molto piccoli risulta utile in quanto spesso nei cibi cotti o trattati si trovano modeste quantità di DNA degradato, danneggiato o non purificato.

Inoltre per quanto riguarda altre applicazioni della metodica PCR in campo alimentare, è molto utilizzata per cercare microrganismi patogeni (pericolosi per l'uomo e animali) nei cibi e nelle materie prime (latte, uova). Per esempio E. coli, Salmonella, L. monocytogenes e altri batteri che possono provocare malattie in seguito alla loro ingestione. Anche in questi casi, cercare il DNA dei batteri per identificarli in modo veloce e sicuro, può essere molto utile in ambito ospedaliero per fornire la cura più efficace alle vittime di un'intossicazione alimentare.