

Estrazione e analisi del DNA da reperti museali

Paolo Francalacci
Giovanna Melas
Domenica A. Obinu

Dipartimento di Zoologia e Genetica evolutiva, Università di Sassari, via Muroni, 25. I-07100 Sassari.
E-mail: pfrancalacci@uniss.it; domenicaobinu@tiscali.it

RIASSUNTO

Lo sviluppo delle tecnologie molecolari avvenuto nell'ultimo decennio ha consentito la possibilità di analizzare il DNA estratto da tessuti antichi, permettendo di ricostruire la storia naturale degli organismi sottoposti ad analisi. Le collezioni museali rappresentano una fonte vastissima di reperti, conservando spesso campioni unici e di grande valore storico. Rappresentano quindi delle vere e proprie banche di biodiversità, e la possibilità di un loro utilizzo per studi paleogenetici risulta di fondamentale importanza. L'analisi di DNA estratto da resti umani conservati in museo permette di ricostruire la storia, sia diacronica sia sincronica, delle popolazioni, i loro movimenti migratori, le modalità di popolamento di una certa area geografica. Due fattori rendono difficile l'analisi dei reperti antichi: la presenza di fattori inibenti che alterano le condizioni degli acidi nucleici ottenuti dai tessuti antichi, e la contaminazione con DNA umano moderno che rende incerto il risultato. Entrambi questi problemi sono fortemente influenzati dalla delicata fase di estrazione del DNA antico. Il presente lavoro approfondisce queste problematiche, riportando alcuni aspetti tecnici relativi all'analisi di reperti museali.

Parole chiave:
paleogenetica, antropologia molecolare, DNA antico.

ABSTRACT

DNA extraction and analysis of museum finds.

The development that molecular technology has witnessed in the past decade has made it possible for us to analyse DNA extracts of tissue from ancient times and this enables us to reconstruct the natural history of the organisms we analyse. Museum collections are a vast source of historical finds and they often contain specimens that are unique or of high historical value. They represent, we could say, banks of biodiversity in their own right and are therefore of fundamental importance to paleogenetic studies. The Dna analysis of human remains preserved at the museum allows us to reconstruct, both synchronically and diachronically, the history of populations, their migratory flows and the ways in which specific geographical areas were peopled. Two factors make the analysis of ancient specimens particularly difficult: the presence of inhibiting elements which alter the state of nucleic acids in ancient specimens, and the contamination of modern human Dna, which makes the result dubious. Both problems are largely associated to the delicate phase of ancient Dna extraction. This text seeks to examine these issues by reporting on some of the technical aspects relevant to the analysis of museum specimens.

Key words:
paleogenetics, molecular anthropology, ancient Dna.

INTRODUZIONE

Il DNA antico (ancient DNA, aDNA) viene utilizzato per ricerche finalizzate a riportare in luce informazioni biologiche del passato come testimonianza, storica e scientifica, racchiusa nel codice genetico che si è conservato, sia pure frammentato e incompleto.

Le collezioni museali rappresentano una fonte vastissima di reperti di interesse biologico, e conservano spesso campioni di valore storico che sarebbe difficile se non impossibile ottenere nuovamente. Pertanto rappresentano delle vere e proprie banche di biodiversità e la possibilità di un loro utilizzo per studi paleogene-

tici risulta di fondamentale importanza. Un reperto museale, così come un sito archeologico, costituisce un problema scientifico aperto, che si cerca di risolvere con la collaborazione di diverse discipline quali l'archeologia, l'antropologia biologica e culturale, la biologia molecolare. Si inizia col ricostruire il contesto storico-archeologico del reperto, al quale si aggiungono i dati forniti da uno studio biologico che oggi si avvale di nuove tecniche per l'analisi del DNA. Naturalmente, i dati forniti da questo tipo di analisi hanno un senso solo se possono essere riferiti a marcatori molecolari che riflettano una variabilità nota nelle popolazioni attuali.

Lo sviluppo delle tecnologie molecolari avvenuto nell'ultimo decennio ha consentito agli antropologi di analizzare il DNA estratto da vari tipi di tessuti antichi (ossa, denti, capelli e tessuti mummificati), permettendo all'Archeologia di identificare anche biologicamente i detentori di una certa cultura ed il loro grado di parentela con altre popolazioni. Questo tipo di conoscenza permette di ricostruire la storia, sia diacronica sia sincronica, delle popolazioni, i loro movimenti migratori e pertanto, le modalità di popolamento di una certa area geografica. In questo modo, il rapporto tra Archeologia ed Antropologia biologica ha ricevuto un nuovo impulso che potrà contribuire alla ricomposizione tra il sapere umanistico e scientifico.

L'antropologia molecolare permette di rispondere ad interrogativi archeologici che l'antropologia classica poteva chiarire solo raramente, come per esempio la possibilità di accertare i rapporti di parentela nel caso di sepolture multiple (ad es. una madre ed i propri discendenti devono possedere lo stesso tipo di DNA mitocondriale), stabilire i pattern di migrazione riguardo alla composizione per sesso dei colonizzatori di una determinata area (ad esempio, se in una data necropoli si trovano scheletri sicuramente identificabili come di sesso femminile, si potrebbe stabilire se si tratta di donne giunte con i colonizzatori o autoctone, a seconda che esse presentino tipi mitocondriali propri solamente delle popolazioni autoctone o risultino essere invece caratterizzanti altre popolazioni).

Fino a pochi anni fa, gli studi di biologia riguardo popolazioni estinte hanno dovuto contare sull'analisi del fenotipo, sia a livello morfologico sia molecolare; infatti, anche se proteine, come collagene o albumina (Prager, 1980; Lowenstein, 1980), o i gruppi sanguigni ABO venivano estratti e analizzati dai tessuti antichi, non erano possibili analisi dirette sul genotipo.

Per questi motivi, la pubblicazione di Higuchi et al. (1984) sull'estrazione e l'isolamento di un gene mitocondriale del *Equus quagga* (un tipo di zebra estinta nel 1858), ebbe un importante impatto sulla comunità scientifica. Questo rappresentava il primo caso in cui le relazioni evolutive tra una specie estinta e i suoi parenti prossimi e viventi, venivano ricostruite a livello genetico. In realtà i primi studi in questo campo furono condotti dai ricercatori cinesi Wang & Lu (1981), ma solo dopo la suddetta pubblicazione il termine "DNA antico" diventò familiare a tutti gli scienziati interessati in studi biologici del passato. Inoltre, questo aprì nuove possibilità negli studi di genetica di popolazioni e filogenetiche, aggiungendo la dimensione temporale a discipline che precedentemente avevano dovuto ricostruire l'evoluzione, contando solo su dati genetici attuali. In questo primo lavoro, Higuchi et al. (1984), usando un campione relativamente recente (muscolo secco proveniente da un esemplare museale di 140 anni), riuscirono a clonare due frammenti di DNA mitocondriale contenenti, ognuno, 112 paia di basi (bp = base-pair) del gene citocromo ossidasi I.

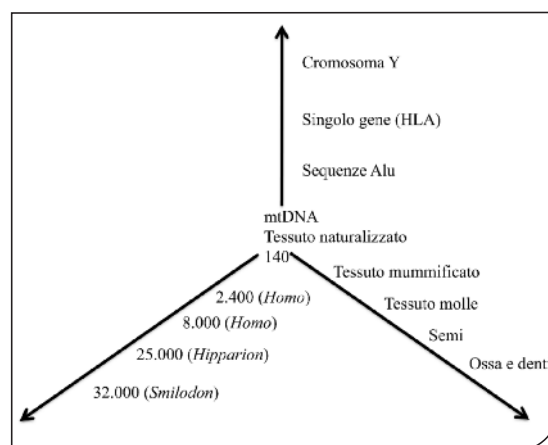


Fig. 1. Progressione negli studi sul DNA antico: sistema genetico, tessuto analizzato, età del reperto.

Numerose ricerche pubblicate durante lo scorso decennio, ampliarono questo lavoro, estendendo la ricerca in molte direzioni, come le varie fonti possibili di aDNA, il tipo di acidi nucleici analizzabili, i polimorfismi rilevabili, le caratteristiche degli esemplari adatti (fig. 1). Poco dopo, fu analizzata una ampia selezione di fonti di aDNA: resti congelati, come nel caso dei muscoli di mammoth (Higuchi & Wilson, 1984; Johnson et al., 1985); resti umani mummificati artificialmente (Pääbo, 1985a,b); tessuti di cervelli umani conservati in un ambiente di torba (Doran et al., 1986); semi di piante (Rogers & Bendich, 1985; Rollo, 1985).

In ogni caso, tutti gli autori incontrarono considerevoli problemi nelle loro analisi a causa dei danni significativi della struttura del DNA, che impedirono o limitarono la possibilità di trattamenti biochimici adeguati. Questi problemi furono notevolmente ridotti con l'introduzione della tecnica detta Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki et al., 1985), che permette un'amplificazione enzimatica in vitro di sequenze specifiche a partire da minime quantità di DNA. Questa tecnica indicata da Pääbo (1987) come quella che avrebbe permesso il migliore studio del aDNA fu poi sviluppata sempre da Pääbo (1990).

PROBLEMI ANALITICI

I primi traguardi nell'estrazione e nell'analisi di DNA antico rappresentano una pietra miliare nell'evoluzione delle metodologie in questo campo, ma l'esplosione dell'intero potenziale in questa ricerca è piuttosto recente. Tuttavia ancora oggi ci sono due fattori che rendono difficile l'analisi dei reperti antichi: la presenza di fattori inibenti che alterano le condizioni degli acidi nucleici ottenuti dai tessuti antichi, e la contaminazione con DNA moderno che rende incerto il risultato. Entrambi questi problemi sono fortemente influenzati anche dalla delicata fase di estrazione del aDNA.

La molecola di DNA, per quanto molto resistente a

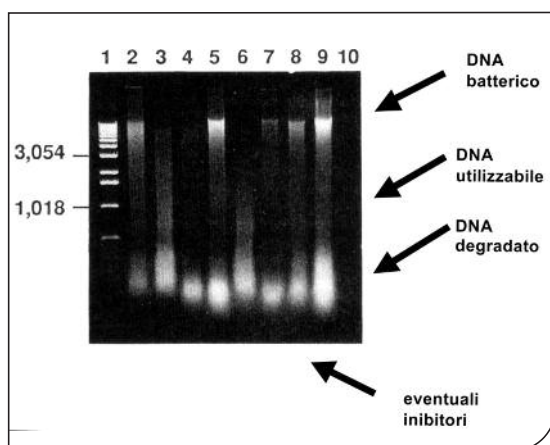


Fig. 2. Esempio di estrazione di DNA da tessuti antichi.

stress termici e in una certa misura anche alla degradazione in relazione all'età del reperto, risulta invece poco stabile in condizioni di pH lontano dalla neutralità. In ambiente acido infatti si ha una spontanea e rapida tendenza alla depurinazione che frammenta la molecola in modo da cancellarne ogni informazione contenuta e renderla inutilizzabile per ulteriori studi. Pertanto, in caso di reperti museali conservati in ambiente liquido, sono da prendere in considerazione principalmente reperti conservati in alcool o fissati in formalina al 10% (che sono peraltro i casi più comuni) mentre in caso di altre preparazioni occorre conoscere preventivamente il pH prima di procedere a ulteriori analisi.

I fattori che comunemente impediscono l'amplificazione (PCR) del aDNA possono variare tra i vari siti di sepoltura e originano sia dall'inquinamento chimico da acido umico, fulvico, idrossiapatite sia dalla degradazione fisica dei reperti come pure dalla forte presenza di acqua nel sito. Il DNA antico si conserva in piccoli e spesso scarsi frammenti: mediamente da 1g di tessuto si possono ottenere da 1 a 100 mg di DNA, una quantità da 10 a 1000 volte inferiore a quella che può essere ottenuta da tessuti freschi. Questo è dovuto all'azione distruttiva di pH fortemente acidi o alcalini del sito, a processi ossidativi, oltre che per i danni dovuti all'azione di endonucleasi (fig. 2).

Il DNA antico può inoltre essere contaminato durante la manipolazione prima e/o dopo l'estrazione. Solo una piccola quantità del DNA che si riesce a recuperare è di origine umana, per la maggior parte si tratta di DNA di origine batterica o fungina, ciò non rappresenta comunque un problema grazie all'elevata specificità della PCR. Al contrario invece anche poche copie di DNA moderno, decisamente meglio conservato e quindi amplificato più velocemente, maschererebbero le sequenze di DNA antico originale portando ad errate interpretazioni.

Poiché molto spesso i resti archeologici sono in uno stato di conservazione tale da non contenere DNA en-

dogeno, prima di procedere all'isolamento del DNA antico, si devono effettuare opportuni esperimenti di controllo. Tra questi il più rapido ed efficace consiste, senza dubbio, nell'analisi dello stato di racemizzazione degli amminoacidi, che permette di identificare, tra i vari resti archeologici, quelli in cui lo stato di preservazione è tale da lasciar supporre che il recupero di aDNA sia possibile. Si procede inoltre all'analisi microscopica delle sezioni sottili ottenute dai resti ossei per identificare quei reperti in cui la microstruttura del tessuto è rimasta integra. In questo modo si restringe l'analisi ai soli reperti che verosimilmente possono contenere DNA amplificabile.

Di norma, per ogni campione si eseguono almeno due estrazioni, amplificazioni e sequenze indipendenti per verificare la concordanza dei risultati. Queste precauzioni sono indispensabili per essere ragionevolmente certi che quello che si sta analizzando sia, in effetti, il DNA estratto dal resto antico.

Il maggior vantaggio della PCR, la possibilità di amplificare una minima quantità di DNA bersaglio, rappresenta il principale pericolo riguardo la sua attendibilità. Questo paradosso è dovuto alla possibile presenza di DNA esogeno, che causa falsi risultati positivi. Tra l'altro il DNA esogeno umano meglio preservato ma accidentalmente presente, è amplificato con una cinetica maggiore delle molecole antiche e maschera le sequenze originali.

Le possibili fonti di contaminazione umana sono differenti (fig. 3). Il primo DNA estraneo può apparire subito dopo la morte o durante le prime fasi della decomposizione. Il sangue o, in generale, i liquidi di un altro individuo possono contaminare la salma prima della sepoltura o nella tomba, specialmente nel caso di sepolture multiple. Naturalmente non c'è modo di prevenire questo tipo di contaminazione, ma è importante riconoscere tale possibilità ed analizzare sempre almeno due campioni dello stesso individuo (che devono produrre sequenze identiche) e più di un individuo. Il tempo che va dallo scavo all'analisi di laboratorio rappresenta la seconda fase cruciale riguardo al rischio di contaminazioni. Cellule di desquamazione della pelle, sudore, capelli, aerosol salivare sono buone fonti di acidi nucleici. Dunque non è improbabile che il campione venga contaminato da DNA di coloro che hanno toccato i reperti, come gli archeologi e i curatori di museo, specialmente se gli scavi e la esposizione in museo sono stati condotti senza prospettare analisi genetiche e quindi senza particolari precauzioni. Questo DNA "vecchio" è probabilmente più danneggiato di quello che si può ottenere da tessuti freschi, visto che può essere stato depositato da pochi giorni a pochi anni prima dell'analisi, ma sarà probabilmente meno degradato di quello proveniente dal reperto in studio, sicuramente molto più antico. Per questa ragione la polimerasi termostabile potrebbe amplificare preferenzialmente questo DNA invece dei frammenti originali. Gli stessi controlli descritti al punto precedente (cam-

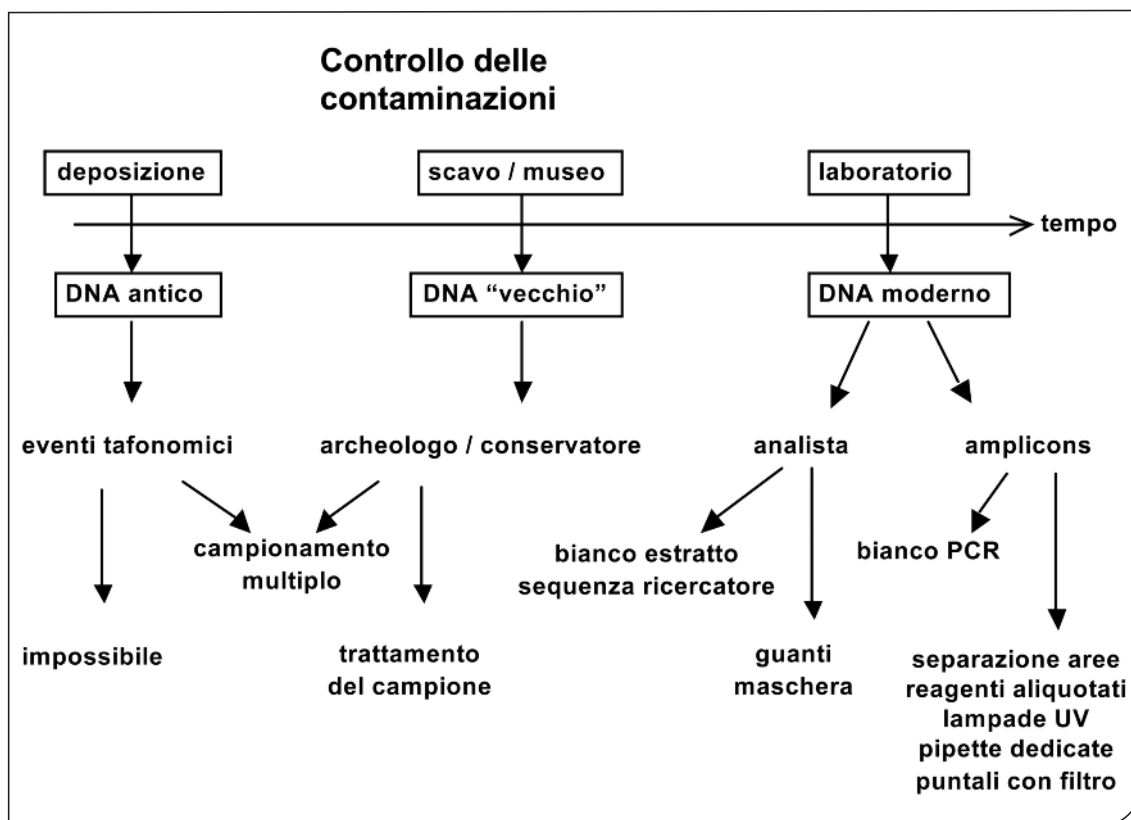


Fig. 3. Possibili fonti di contaminazione del DNA antico e loro riconoscimento e prevenzione.

pionamento multiplo e molti individui analizzati) sono necessari per attestare l'autenticità dei risultati. Per evitare questo tipo di contaminazioni è necessario indossare guanti usa e getta e mascherina facciale al momento dello scavo e usare lame sterili per campionare e provette sterili per la raccolta. Se questa procedura non è possibile, come nel caso di campioni precedentemente raccolti e manipolati, è consigliabile campionare le parti del corpo meno esposte e di scartare le parti superficiali dei reperti. Un trattamento con psoralene e successivo irradiazione con ultravioletti a corta lunghezza d'onda (254 nm) può distruggere gli acidi nucleici superficiali, contribuendo ad una migliore pulizia del campione.

trattamento del campione in laboratorio rappresenta l'ultima fase critica e le contaminazioni a questo livello possono essere dovute a due cause ben distinte: DNA genomico completo dovuto a vetreria o reagenti non perfettamente puliti, o direttamente da cellule del ricercatore, e il cosiddetto "carryover da amplicons". La prima causa può essere circoscritta da uno stretto controllo dell'ambiente di laboratorio, con un uso costante di guanti, maschere facciali, l'uso preferenziale di contenitori, pipette e provette di plastica monouso e l'intensivo uso di cappa aspirante e di camere sterili a raggi UV a corta lunghezza d'onda. Per scoprire questo tipo di contaminazioni è essenziale disporre di controlli del-

l'estratto, ovvero effettuare, in parallelo agli estratti di tessuto, uno o più bianchi nei quali tutti i reagenti usati vengono sottoposti agli stessi trattamenti che prevede il protocollo per il campione. La tipizzazione del ricercatore è anche raccomandabile, per comparazione con i risultati ottenuti dal campione antico.

Il secondo punto merita una particolare attenzione. Visto che la PCR in una singola reazione produce miliardi di copie (generalmente chiamate "amplicons") della specifica sequenza bersaglio, perfino le microscopiche particelle di aerosol che si possono generare al momento della apertura delle provette contengono un numero di molecole sufficiente per produrre amplificazione. Il trasferimento accidentale di prodotti PCR a provette pronte per la amplificazione enzimatica è chiamato "carryover". La possibilità di carryover cresce in proporzione con l'aumentare del numero delle reazioni in laboratorio, a meno che venga adottato un protocollo di PCR molto stringente e che vengano prese adeguate precauzioni. Per evidenziare questo tipo di contaminazioni occorre effettuare di routine un controllo negativo della reazione di PCR (da non confondere con il controllo dell'estratto). La reazione nella quale sono aggiunti tutti i reagenti meno il DNA non deve dare alcun prodotto. È assolutamente indispensabile escludere ogni contatto tra campioni e decontaminare tutti i reagenti usati. Dovrebbero essere separate le

aree dedicate alla preparazione dei campioni e delle reazioni di PCR da quelle dedicate al lavoro post PCR. Si devono usare due set di pipette separati per i due momenti. L'uso di puntali con il filtro evita il contatto della superficie della pipetta con l'aerosol, evitando il passaggio di molecole di amplicons tra tubo e tubo. I reagenti usati devono essere autoclavati e conservati in aliquote, per facilitarne la sostituzione qualora risultassero contaminati.

METODOLOGIE DI ESTRAZIONE E ANALISI

Il DNA di reperti come ossa, denti e tessuti antichi è tipicamente degradato in piccoli frammenti minori di 300 bp, spesso di sole 50-200 bp. L'estrazione e la successiva risulta quindi particolarmente difficile perché i metodi utilizzati attualmente non sono sempre soddisfacenti, infatti uno dei limiti dello studio di reperti archeologici e museali, è l'impossibilità di utilizzare un unico metodo di riferimento.

La fase pre-amplificazione deve essere condotta in ambienti e con strumenti dedicati per limitare la contaminazione da altro DNA amplificato o da parte di DNA dell'operatore. Il campione deve essere liberato da ogni altro eventuale materiale residuo prima di procedere alla sua analisi. Ogni lavoro di estrazione e pre-PCR deve essere svolto in un ambiente sterile, separato da aree dove si effettuano i lavori post-PCR. L'operatore deve frequentare i locali dove si trovano DNA amplificati e luoghi dove si effettua l'amplificazione. L'operatore munito di mascherina e guanti sterili, procede all'interno di un ambiente protetto quale una cappa a flusso laminare verticale, alla pulitura superficiale del campione con uno spazzolino o un bisturi sterile. Successivamente il campione viene esposto all'azione dei raggi UV a 240 nm per 30', nel caso di reperti ossei o all'azione dell' HCl in caso di reperti dentali.

Il campione viene poi polverizzato preferibilmente prelevando la parte interna meno esposta agli agenti inquinanti. La parte residua del campione, o la polvere pronta per l'estrazione, deve essere conservata all'interno di contenitori sterili a -20°C. Devono sempre essere usati guanti sterili, puntali con filtro e tutto l'equipaggiamento da laboratorio deve essere sterilizzato (mediante irradiazione con UV e/o lavaggio con ipoclorito di sodio) nell'allestimento della PCR.

Per controllare e verificare eventuali contaminazioni con DNA estraneo a quello del campione è bene effettuare sempre un controllo negativo. Tutte le estrazioni dovrebbero essere fatte almeno due volte e il risultato non dovrebbe mai essere considerato corretto prima del loro confronto. Per testare la presenza di DNA esogeno, si può tentare ad amplificare frammenti di circa 500 bp e se ciò riesce è molto probabile che sia presente contaminazione giacché il DNA antico raramente si amplifica in frammenti più lunghi di 200 bp.

È fondamentale ricordare che si sta lavorando con un reperto unico di interesse antropologico ottenuto con un metodo distruttivo dal campione originale per cui è bene utilizzare solo la quantità minima necessaria per cercare di danneggiare il meno possibile il reperto. Questo è un incentivo in più per creare nuovi metodi sempre più efficienti per ridurre il rischio di contaminazione e aumentare l'efficienza dei risultati. I metodi di estrazione del aDNA ricalcano quelli comunemente noti, ma poiché in questo caso molti sono i fattori che hanno influito nel tempo nella degradazione del DNA è quasi impossibile stabilire a priori quale protocollo sarà più adatto per un dato campione. Si può certamente valutare lo stato attuale dei reperti per valutare inizialmente quali inquinanti chimici sono presenti, ma non è possibile conoscere la situazione chimico-fisica del passato e le sue variazioni che, nel corso del tempo, hanno modificato la struttura dei reperti.

Si elencano, di seguito, alcune delle metodologie più utilizzate per l'analisi del aDNA, con particolare riferimento a reperti museali conservati in liquido.

Metodo fenolo/cloroformio

Questa è la procedura più comune usata per ottenere molecole di aDNA e consiste in una fase di parecchie ore di incubazione a 37°C del tessuto antico ridotto in polvere, con un buffer acquoso che normalmente, contiene (i rapporti delle concentrazioni possono variare secondo gli autori) EDTA (un agente chelante del calcio), TRIS-HCl (per stabilizzare il pH della soluzione), NaCl, SDS (un agente denaturante), collagenasi o proteinasi-K (enzimi proteolitici) (Pääbo et al., 1988). Successivamente si elimina la componente proteica con fenolo equilibrato a pH 8,00. Quindi si rimuovono le tracce di fenolo utilizzando dapprima una mix in fenolo/cloroformio/isoamilico (25:24:1) e successivamente di cloroformio/isoamilico (24:1) puro. Infine si recupera il DNA per precipitazione con etanolo al 70%, o con isopropanolo (che lo disidrata e lo rende visibile). L'etanolo viene allontanato ed il DNA risospeso in acqua sterile o in TAE o TBE. Nel caso del aDNA le quantità sono talmente basse che gli acidi nucleici vengono recuperati e purificati su membrane con l'utilizzo di microconcentratori. Questa metodologia, di semplice applicazione, produce una buona resa, ma spesso coprecipitano insieme al DNA sostanze inibenti l'amplificazione enzimatica (Hagelberg & Clegg, 1991).

Metodo Guanidina isotiocianato-Triton-Silica (Persson, 1992)

Il metodo è piuttosto simile al protocollo per la purificazione pubblicato nel 1990 (Boom et al., 1990), la principale differenza risiede nell'aggiunta di buffer fosfato. È stato specificatamente designato per estrarre il DNA dall'idrossiapatite dell'osso. La Guanidina isotiocianato è un agente caotropico che distrugge le proteine. Il DNA è poi adsorbito su silice per essere prima purificato e poi eluito. La tendenza di frammenti di

DNA ad adsorbirsi a particelle di silice in presenza di un sale caotropico fu scoperta da Vogelstein e Gillespie (1979). Il Triton X-100 è invece un potente detergente.

Metodo Chelex

Consiste nell'ebollizione della polvere d'osso in sospensione nel Chelex (una resina chelante), seguito da PCR del supernatante (Walsh et al., 1991). Gli esperimenti che confrontano le tecniche del fenolo-cloroformio e del Chelex dimostrano che sebbene il metodo del Chelex sia semplice e veloce, gli inibitori non vengono del tutto allontanati nella maggior parte dei casi.

Metodi per tessuti conservati in formalina

La formalina è uno dei fissativi maggiormente usati per reperti museali, grazie alla sua economicità, facilità d'uso, e per la ottima resa delle strutture morfologiche. Al contrario della conservazione in alcol, che non danneggia il DNA, la fissazione in formaldeide porta ad una estensiva frammentazione degli acidi nucleici, in seguito alla formazione di *cross-links*. Il metodo prevede il trattamento del tessuto in un buffer di lisi contenente Tween 20 e proteinasi K, il DNA viene concentrato e precipitato in etanolo e sodio acetato (Lehmann & Kreipe, 2001). Varianti del metodo sono proposti da altri autori, che prevedono l'uso di resine chelanti nella fase di estrazione (Legrand et al., 2002).

Metodo per la riparazione dell' aDNA

Francalacci e Warburton (1992) usarono un semplice metodo per cercare di ottenere molecole stampo di aDNA più lunghe basandosi sull'effetto "jumping" della polimerasi, osservato da Pääbo et al. (1990). Secondo questo modello, la polimerasi termostabile, in presenza di DNA danneggiato o frammentato, usa diversi frammenti di DNA che possono fungere da stampo, producendo così amplificati più lunghi delle sequenze originariamente presenti. Nel caso dell'amplificazione di un gene multiallelico potrebbero essere prodotte molecole chimeriche, come si osserva qualche volta in templati antichi (Lawlor et al., 1991; Francalacci et al., 1992). La normale amplificazione deve essere preceduta dalla PRE-PCR dove tutti i reagenti necessari sono presenti tranne i due primers specifici. Il DNA degradato in piccoli frammenti, in siti casuali, può trovare il suo complementare e appaiarsi con questo, si innesca quindi l'azione della polimerasi e l'estensione della molecola.

Le temperature di annealing devono essere mantenute alte, per evitare gli appaiamenti non specifici. Ad ogni ciclo si producono DNA più lunghi più adatti all'amplificazione. La PCR è successivamente condotta con l'aggiunta di nuova polimerasi termostabile e dei due primers specifici. Il risultato mostra un significativo miglioramento rispetto al templatato amplificato direttamente senza PRE-PCR che potrebbe dare scarsi o nessun prodotto.

BIBLIOGRAFIA

- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim Van Dillen P.M.E., Van Der Noordaa J., 1990. *Rapid & simple method for purification of nucleic acid*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 495-503.
- Doran H.G., Dickel D.N., Ballinger W.E., Agee O.F., Laipis P.J., Hauswirth W.W., 1986. *Anatomical, cellular & molecular analysis of a 8,000-yr-old human brain tissue from the Windover archaeological site*. *Nature*, 323: 803-806.
- Francalacci P., Romani M., Borgognoni Tarli S.M., Cavalli Sforza L.L., 1992. *Chimeric HLA alleles from ancient molecules*. *Ancient DNA Newsletter*, 2: 10-11.
- Fancalacci P., Warburton P.E., 1992. *Pre-amplification without primers (Pre-PCR): a method to extend ancient molecules*. *Ancient DNA newsletter*, 2: 10-11.
- Hagelberg E., Clegg J.B., 1991. *Isolation & characterization of DNA from archaeological bone*. *Proc. R. Soc. London B*, 244: 45-50.
- Higuchi R., Bowman B., Freibenger M., Ryder O.A., Wilson A.C., 1984. *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. *Nature*, 312: 282-284.
- Higuchi R.G., Wilson A.C., 1984. *Recovery of DNA from extinct species*. *Fedn. Proc.*, 43: 1557.
- Johnson P.H., Olson C.B., Goodman M., 1985. *Prospect for the molecular biological reconstruction of woolly mammoth's evolutionary history: isolation & characterization of the deoxyribonucleic acid from the tissue of Mammuth primigenius*. *Acta Zoologica Fennica*, 170: 225-231.
- Lawlor D.A., Nickel C.D., Hauswirth W.W., Parham P., 1991. *Ancient HLA genes from 7,500 years-old archaeological remains*. *Nature*, 349: 785-788.
- Legrand B., de Mazancourt P., Durignon M., Khalifata V., Crainic K., 2002. *DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues*. *Forensic Science International*, 125: 205-211.
- Lehmann U., Kreipe H., 2001. *Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies*. *Methods*, 25: 409-418.
- Lowenstein J.M., 1980. *Species-specific proteins in fossil*. *Naturwissenschaften*, 67: 343-346.
- Perrson P., 1992. *A method to recover DNA from ancient bones*. *Ancient DNA Newsletter*, 1: 45-46.
- Pääbo S., 1985a. *Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies*. *Journal of Archaeological Science*, 12: 411-417.
- Pääbo S., 1985b. *Molecular cloning of ancient DNA Egyptian mummy*. *Nature*, 314: 644-645.
- Pääbo S., 1987. *Molecular genetic method in archaeology. A prospect*. *Anthropol. Anzeiger*, 45: 9-17.
- Pääbo S., Gifford J.A., Wilson A.C., 1988. *Mitochondrial DNA sequences from a 7000 year old brain*. *Nucleic Acids Researches*, 16: 9775-9787.
- Pääbo S., 1990. *Amplifying ancient data. In PCR protocols. A guide to methods & amplifications*. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T.(eds.), Academic Press, New York, pp. 159-166.
- Prager E.M., Wilson A.C., Lowenstein J.M., Sarich V.M., 1980. *Mammoth albumin*. *Science*, 209: 287-289.

- Rogers S.O., Bendich A.J., 1985. *Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology*, 5: 69-76.
- Rollo F., 1985. *Characterization by molecular hybridisation of RNA fragments isolated from ancient (1400 BC) seeds. Theoretical application in genetics*, 71: 330-33.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science*, 230: 1350-1354.
- Vogelstein B., Gillespie D., 1979. *Preparative & analytical purification of DNA from agarose. Proceedings National Academy Sciences U S A*, 76: 615-619.
- Wang G.H., Lu C.C., 1981. *Isolation & identification of nucleic acids of the liver from a corpse from the Changsa Han tomb (in Chinese). Shen Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Li Chin Chan*, 39: 70-75.
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R., 1991. *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques*, 10: 506-13.