



UNIVERSITÀ DI PARMA

ARCHIVIO DELLA RICERCA

University of Parma Research Repository

La determinazione quantitativa del DNA genomico umano mediante tecnica Dot Blot

This is the peer reviewed version of the following article:

Original

La determinazione quantitativa del DNA genomico umano mediante tecnica Dot Blot / Buscemi, L.; Bianchi, F.; Cucurachi, Nicola; Pasquali, A.; Tagliabracci, A.; Rodriguez, D.. - In: RIVISTA ITALIANA DI MEDICINA LEGALE. - ISSN 1124-3376. - XVIII:6(1996), pp. 1387-1392.

Availability:

This version is available at: 11381/2785323 since: 2015-02-18T12:23:55Z

Publisher:

Published

DOI:

Terms of use:

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available

Publisher copyright

note finali coverpage

(Article begins on next page)

14 July 2024

Loredana Buscemi - Francesca Bianchi - Nicola
Cucurachi - Alessandro Pasquali - Adriano Tagliabracci
Daniele Rodriguez

**LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA
DEL DNA GENOMICO UMANO
MEDIANTE TECNICA DOT BLOT**

Estratto



Milano • Giuffrè Editore

**CASISTICA
E RICERCA SPERIMENTALE**

**LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL DNA
GENOMICO UMANO MEDIANTE TECNICA DOT BLOT**

di LOREDANA BUSCEMI, FRANCESCA BIANCHI,
NICOLA CUCURACHI, ALESSANDRO PASQUALI,
ADRIANO TAGLIABRACCI e DANIELE RODRIGUEZ *

Parole chiave: determinazione quantitativa del DNA; analisi dot blot;
locus D17Z1 (p17H8)

Key words: determination of DNA quantity; dot blot analysis; locus
D17Z1 (p17H8)

Introduzione.

La determinazione quantitativa del DNA estratto da reperti forensi, rappresentati da materiale di diversa natura biologica (sangue, sperma, capelli, saliva, ecc.), il più delle volte scarso o degradato, e del DNA antico [1], è di fondamentale importanza per decidere le strategie analitiche da impiegare a fini identificativi. Disponendo, infatti, di adeguate quantità di DNA, la notevole sensibilità della tecnica polymerase chain reaction (PCR) [2], tecnica ormai di elezione per questo tipo di indagini, consente un'analisi di più sistemi polimorfici, che potranno essere individuati sulla base delle esperienze maturate da ciascun laboratorio di emogenetica forense. Nel caso in cui la quantità di DNA sia estremamente ridotta, limitata a pochi nanogrammi, o meno, si impone di destinare tutto il materiale estratto ad un

* Istituto di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Ancona, via Conca, 60020 Torrette-Ancona.

solo sistema PCR, da scegliere ovviamente fra quelli più informativi, o di passare direttamente allo studio del DNA mitocondriale (fusto di capello, DNA antico) [3, 4, 5, 6, 7].

Il metodo più semplice per la determinazione quali-quantitativa del DNA consiste nel sottoporre un'aliquota dell'estratto ad elettroforesi in gel d'agarosio ed a successiva visualizzazione del DNA presente con etidio-bromuro (1) mediante fluorescenza a luce UV [10]. Il confronto con diluizioni di DNA genomico umano standard permette una stima della concentrazione di DNA. Al tempo stesso il gel test evidenzia se il DNA è degradato. Questa tecnica, tuttavia, non è specifica per il DNA genomico umano, problema da non sottovalutare nell'analisi di campioni forensi che potrebbero essere costituiti da DNA appartenente a specie diversa da quella umana o essere stati contaminati da DNA di natura batterica o fungina.

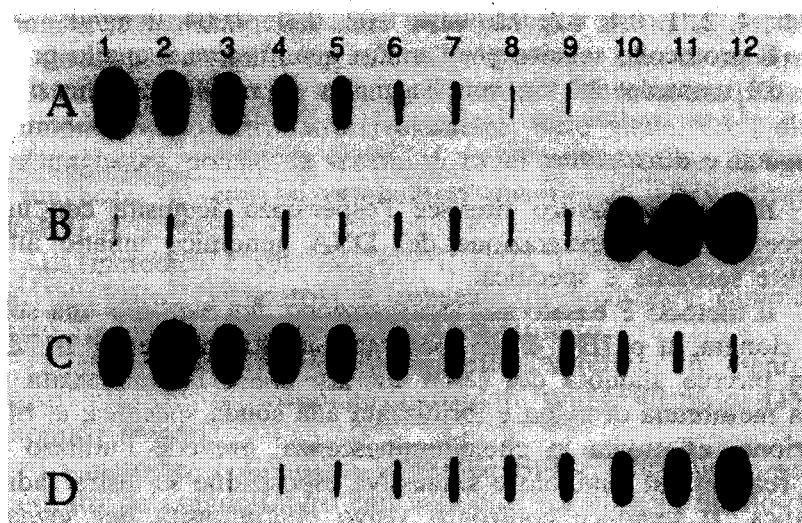
La contestuale quantizzazione e diagnosi di specie del DNA estratto da reperti forensi può essere ottenuta mediante ibridizzazione dot blot con sonde specie-specifiche [11, 12] e successiva rilevazione in chemiluminescenza [12, 13].

Il seguente studio mostra l'esperienza acquisita nel nostro Istituto utilizzando una sonda clonata, la p17H8, che rileva una sequenza altamente ripetitiva di un locus alfa-satellite umano, il D17Z1, presente nella regione centromerica del cromosoma 17 in 500-1.000 copie [14].

Gli studi condotti da Waye e collaboratori [11] hanno mostrato fenomeni di ibridizzazione crociata con altre specie animali (topo), ma il segnale è decisamente più intenso (50 volte) per il DNA genomico umano rispetto ad equivalenti quantità di DNA di provenienza non umana, per cui, alle condizioni di lavoro previste dalla tecnica, la sonda può essere considerata specie-specifica.

(1) L'etidio bromuro (EtBr) è una sostanza carica positivamente che può intercalarsi fra i filamenti che costituiscono la doppia elica del DNA, generando l'emissione di fluorescenza a luce UV. Utilizzando un gel d'agarosio, il limite di sensibilità è per quantità di DNA dell'ordine di 10 ng. Allorché si tratta di DNA denaturato, l'affinità dell'etidio bromuro per il singolo filamento di DNA è molto bassa e il segnale fluorescente è molto debole, al limite del potere risolutivo [8, 9].

FIGURA 1 - *Determinazione quantitativa del DNA genomico umano mediante ibridizzazione dot blot con la sonda p17H8.*



A1-A11 - D12-D2: DNA genomico umano standard (K562): 40, 20, 10, 4, 2, 1, 0,4, 0,2, 0,1, 0,04, Ong.

B1-C1: reperti umani estratti in chelex: tracce ematiche allestite su vari substrati — stoffa (B1), vetro (B2), carta (B3) — sangue intero (B4-B5), capello (B6-B9), traccia di sperma (B10), sperma (B11), cellule spermatiche ottenute dopo lisi differenziale (B12), mozzicone di sigaretta (C1). C2-C12: diluizioni in serie di campioni di sangue intero estratti in fenolo-cloroformio.

Materiali e metodi.

Il DNA è stato estratto con metodica chelex [15] per i seguenti reperti umani (Figura 1): tracce allestite con 3 μ l di sangue su vari substrati — stoffa (B1), vetro (B2), carta (B3) —, conservate a temperatura ambiente per 5 anni, sangue intero (B4-B5), capello della lunghezza di 3 cm. con radice (B6-B9), traccia di sperma (B10), sperma (B11), cellule spermatiche ottenute tramite lisi differenziale (B12), mozzicone di sigaretta (C1). Campioni di sangue intero sono stati estratti in fenolo-cloroformio [16] e diluiti in serie (Figura 1: C2-C12).

Per la quantizzazione del DNA è stato impiegato un kit commerciale, l'ACESTM 2.0+ Human DNA Quantitation System (GIBCO-BRL) che prevede l'ibridizzazione del DNA con la

sonda p17H8. Gli standards di DNA genomico umano, costituiti dalla linea cellulare K562, sono forniti alle seguenti concentrazioni: 4, 2, 1, 0.4, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.01, 0.004, 0 ng/ μ l.

Il protocollo seguito per l'analisi quantitativa è quello previsto dal manuale del kit, con l'aggiunta di minime modificazioni.

Risultati e discussione.

Il presente lavoro riferisce l'esperienza acquisita con una procedura di quantizzazione del DNA genomico umano altamente sensibile e specifica.

Il metodo è basato sull'ibridizzazione dot blot con una sonda clonata, la p17H8, di un locus alfa satellite umano, il D17Z1: una piccola aliquota del DNA estratto viene immobilizzata su una membrana di nylon e ibridizzata alla sonda specifica; la rilevazione, effettuata in chemiluminescenza, prevede l'utilizzo di un reagente al luminolo e successiva esposizione su lastra radiografica. Il semplice confronto visivo dell'intensità del segnale emesso dall'estratto da analizzare con quello emesso da diluizioni note di DNA umano standard permette di stabilire la quantità di DNA in esame.

Secondo la nostra esperienza, un punto critico della metodica è risultato essere il mantenimento costante a 18 cm Hg della pressione di aspirazione per la filtrazione del volume del campione depositato nell'apparecchiatura slot blot.

Particolare attenzione deve essere posta durante la fase di ibridizzazione con la sonda oligonucleotidica per mantenere la temperatura costante a 50°C; nel corso della stessa fase è importante evitare l'essiccamento della membrana, anche mediante aggiunta di ulteriori aliquote di soluzione di ibridizzazione.

È consigliabile un'esposizione su lastra radiografica di 45 minuti per ottenere un'immagine nitida e priva di aloni; prolungando il tempo di esposizione a 60-90 minuti è possibile rivelare campioni presenti a bassa concentrazione che potrebbero risultare falsamente negativi dopo una esposizione di 45 minuti; tale accorgimento, tuttavia, comporta una perdita in nitidezza dei campioni più concentrati.

I risultati ottenuti nel presente studio sono mostrati nella figura 1. La nostra esperienza ha confermato che da reperti allestiti con la stessa quantità di materiale biologico si estraggono differenti quantità di DNA, a seconda del substrato e delle con-

dizioni di conservazione. Tracce, infatti, allestite in laboratorio con un ugual volume di sangue (3 μ l) e lasciate invecchiare per 5 anni a temperatura ambiente, presentavano all'analisi dot blot una diversa intensità di segnale in relazione al tipo di substrato considerato (B1-B3). Per quanto riguarda, le formazioni pilifere, assumono rilievo altri fattori (diametro, ciclo vitale, ecc.) oltre alla lunghezza, poiché da sezioni di capello, con radice, di uguale lunghezza (3 cm.) si ottenevano quantità di DNA diverse (B6-B9).

La metodica è specifica per il DNA umano, non prevede l'uso di isotopi radioattivi e consente di analizzare campioni estratti in chelex, contenenti DNA denaturato.

L'intera procedura può essere portata a termine in meno di quattro ore, con la possibilità di rivelare fino a 40 pg di DNA genomico umano.

La metodica è altamente affidabile. Stesse diluizioni in serie di estratti da sangue intero con metodica organica in fenolo-cloroformio (C2-C12) sono state considerate per più ibridizzazioni dot blot con medesimi risultati in termini di quantità di DNA (dati non mostrati).

In conclusione, la quantizzazione del DNA genomico umano mediante analisi dot blot appare come una metodica rapida, altamente sensibile e specifica per il DNA genomico umano, da configurarsi come indispensabile e preliminare approccio nei casi in cui la quantità di DNA è ridotta o il DNA è degradato.

RIASSUNTO

Il presente lavoro illustra un metodo semplice e sensibile per la determinazione quantitativa specifica del DNA genomico umano, basato sull'ibridizzazione dot blot con la sonda p17H8 di un locus alfa satellite umano, il D17Z1.

SUMMARY

The present work describes a simple and sensitive method for the specific quantitation of human genomic DNA, based on the dot blot hybridization of the p17H8 probe to a human alpha satellite locus, D17Z1.

BIBLIOGRAFIA

- [1] PÄÄBO S., *Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1939, 1989.
- [2] SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia*, Science 230, 1350, 1985.
- [3] HIGUCHI R.G., BEROLDINGEN C.H. VON, SENSABAUGH G.F., EHRlich H.A., *DNA typing from single hairs*, Nature 332, 543, 1988.
- [4] PÄÄBO S., GIFFORD J.A., WILSON A.C., *Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year-old brain*, Nucleic Acids Res. 16, 9975, 1988.
- [5] HOLLAND M.M., FISCHER D.L., MITCHELL L.G., RODRIGUEZ W.C., CANIK J.J., MERRIL C.R., WEEDN V.W., *Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War*, J. Forensic Sci. 38, 542, 1993.
- [6] WILSON M.R., STONEKING M., HOLLAND M.M., DI ZINNO J.A., BUDOWLE B., *Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science*, Crime Lab. Digest. 20, 68, 1993.
- [7] GILL P., IVANOV P. L., KIMPTON C., PIERCY R., BENSON N., TULLY G., EVETT I., HAGELBERG E., SULLIVAN K., *Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*, Nature Genet. 6, 130, 1994.
- [8] OSTERMAN L.A., *Electrophoresis of nucleic acids*, in: *Methods of protein and nucleic acid research*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo 1, 102, 1984.
- [9] GERSTEN D.M., ZAPOLSKI E.J., *Detection and quantification of DNA in electrophoresis gels and blots*, in: *Advances in electrophoresis*, Edited by Chrambach A., Dunn M.J., Radola B.J., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 4, 49, 1991.
- [10] SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., *Preparation and examination of agarose gels*, in: *Molecular cloning. A laboratory manual - Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1, 6.9, 1989.
- [11] WAYE J.S., PRESLEY L.A., BUDOWLE B., SHUTLER G.G., FOURNEY R.M., *A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts*, BioTechniques 7, 852, 1989.
- [12] WALSH P.S., VARLARO J., REYNOLDS R., *A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA*, Nucl. Acids Res. 20, 5061, 1992.
- [13] DUBITSKY A., BROWN J., BRANDWEIN H., *Chemiluminescent detection of DNA on Nylon membranes*, BioTechniques 13, 392, 1992.
- [14] WAYE J.S., WILLARD H.F., *Structure, organization and sequence of alpha satellite DNA from human chromosome 17. Evidence for evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome*, Mol. Cell. Biol. 6, 3156, 1986.
- [15] WALSH P.S., METZGER D.A., HIGUCHI R., *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material*, BioTechniques 10, 506, 1991.
- [16] BUDOWLE B., BAECHEL F.S., *Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing*, Appl. Theor. Electrophoresis 1, 181, 1990.