



# 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)

24 February 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







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/ $\mu$ 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  $\mu$ 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.