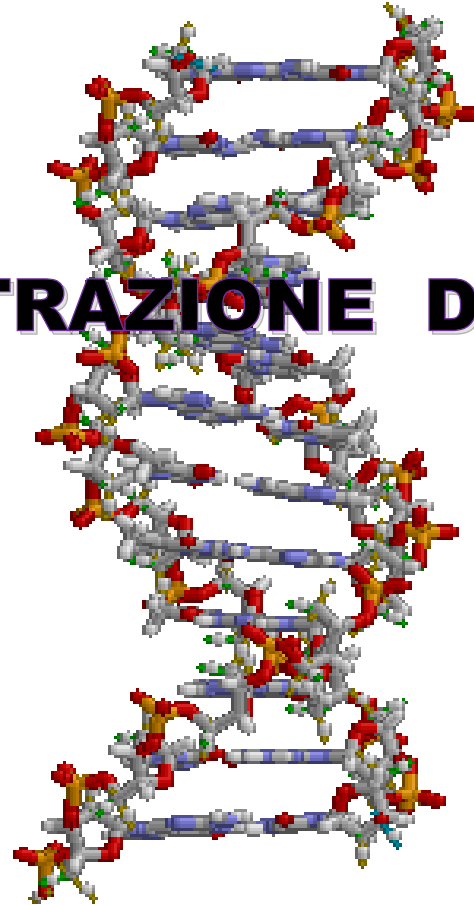


L'ESTRAZIONE DEL DNA



PIANIFICAZIONE DI UN ESPERIMENTO IN LABORATORIO

(7 punti)

PIANIFICAZIONE DI UN ESPERIMENTO IN LABORATORIO

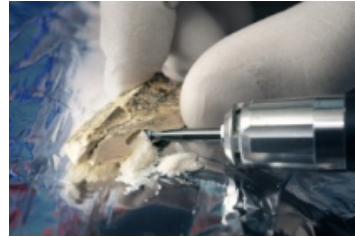
(7 punti)

1. *Qual è il materiale biologico di partenza?*
2. *Cosa dobbiamo estrarre?*
3. *Qual è la problematica (es. gDNA da tessuto animale e devo fare PCR per il gene COI)?*
4. *Avere a disposizione di un PC collegato a internet*
5. *Ricerca i riferimenti bibliografici → metodiche e strumentazione adeguata*
6. *Preparare le soluzioni opportune*
7. *Prenotare la strumentazione comune in laboratorio*

Pianificazione di un esperimento



Scopo: Determinare il pedigree di razze e semi



Estrazione di DNA da osso/denti

Scopo: identificare DVM



Scopo:
identificare/scagionare potenziali sospettati, persone accusate; identificare vittime



Scopo: Identificare specie protette e in via di estinzione



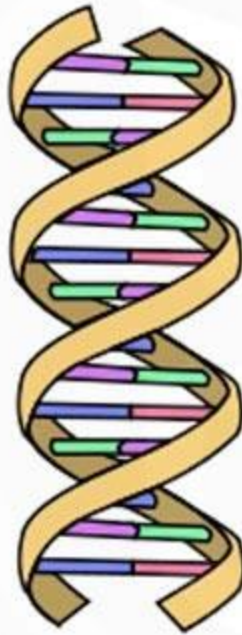
Scopo: Stabilire la paternità o altre relazioni familiari



Scopo: Autenticare alimenti (frodi)

Estrazione del DNA/RNA

DNA



**IL MIO
DNA**



Estrazione del DNA/RNA

a) Comportamenti operatore e organizzazione del lavoro

- 1) guanti, sterilità;
- 2) strumentazione dedicata per ogni area

b) Suddivisione fisica aree di lavoro

1. Preparazione del campione biologico
2. Per l'amplificazione (PCR)
3. Per l'analisi degli ampliconi (elettroforesi)

Tecniche di estrazione per il DNA

- Qualità del campione di partenza
- Numero di campioni
- Costo
- Tempo
- Semplicità e affidabilità
- Automazione
- Sicurezza

Tecniche di estrazione per il DNA

- Qualità del campione di partenza
- Numero di campioni
- Costo
- Tempo
- Semplicità e affidabilità
- Automazione
- Sicurezza

Qualità del campione di partenza

☐ Sangue

☐ Saliva

☐ Urina

☐ Capelli/peli/penne

☐ Denti

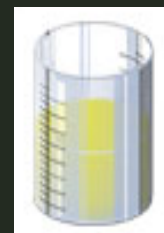
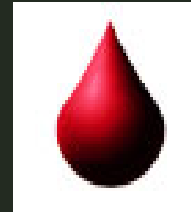
☐ ossa

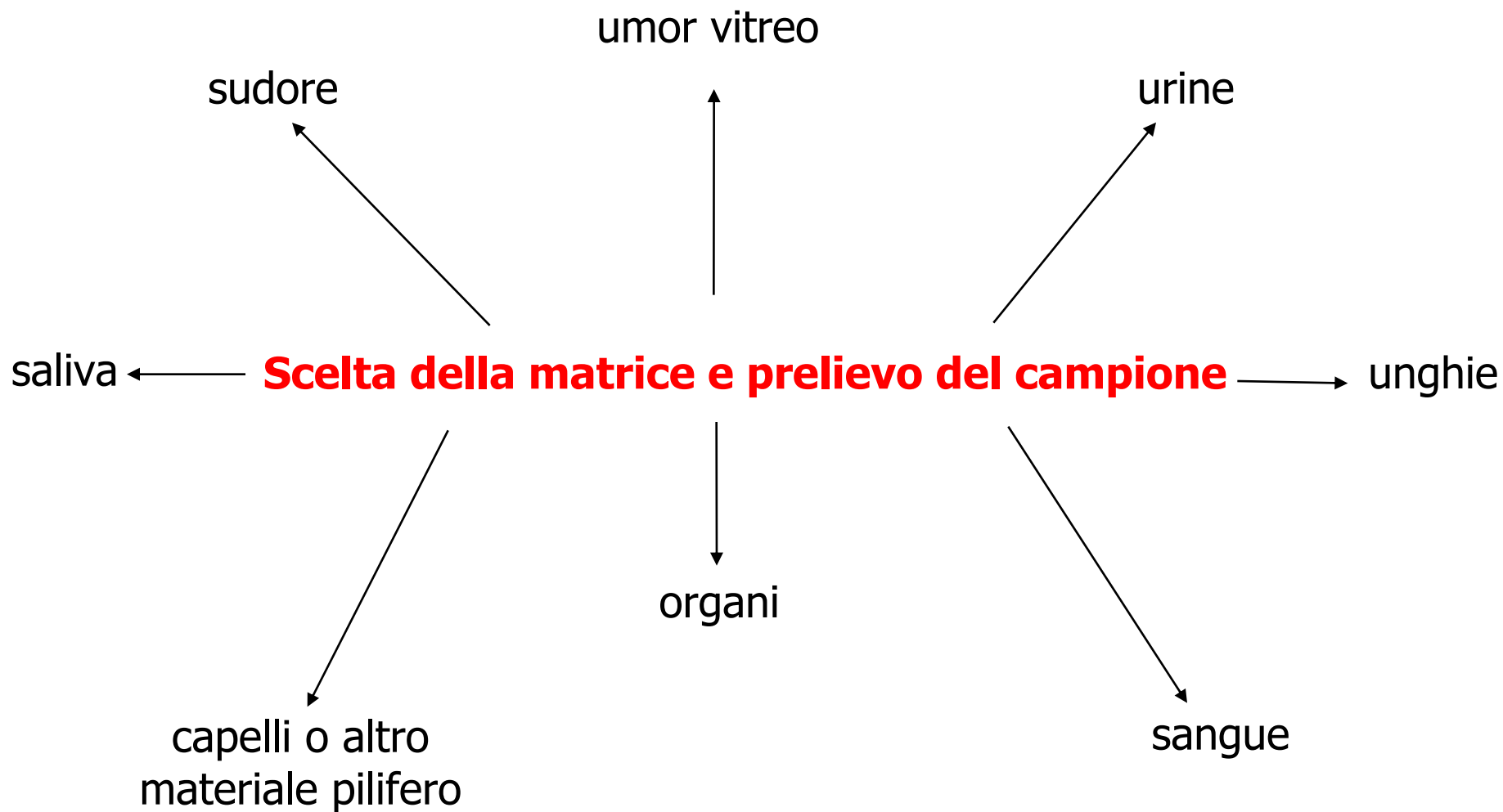
☐ tessuto

☐ Liquido seminale

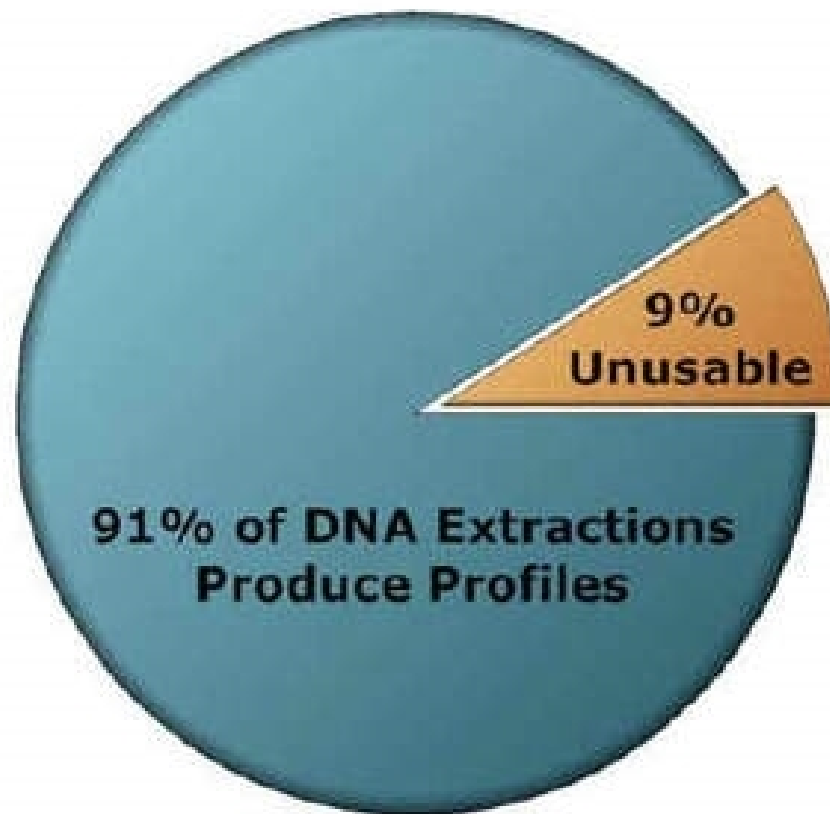
☐ feci

☐ Animale in toto





DNA Extractions Yeilding DNA Profiles



Qualità del campione di partenza

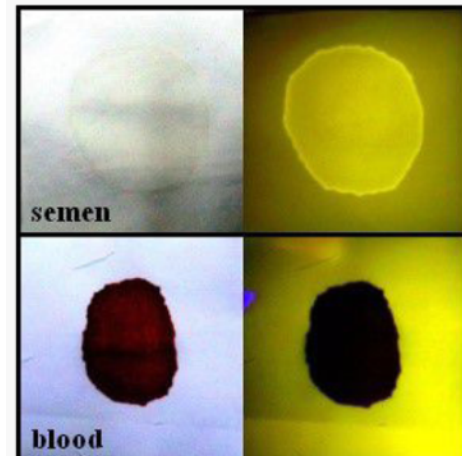


un film di **SERGIO LEONE**
CLINT EASTWOOD ELI WALLACH LEE VAN CLEEF

con ALDO GIUFFRÈ ANTONIO CASAS EADA RASHIDOV ALDO SAMBRI ENZO PETITO LUIGI PISTOLE
LIVIO LORENZINI AL MULINO E SERGIO MONTAZZALI MERINO RUFFO LORENZO BOLLER
e con MARIO ERICA musiche di ENNO MORRICONE
prodotti da ALBERTO GRIMALDI per la P.E.A. - Produzioni Europee Associate



The «Good» DNA



Sangue , saliva & seme

ORIGINAL ARTICLE

Open Access

Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example



Jae Joseph Russell B. Rodriguez^{1,2} , Gayvelline C. Calacal¹, Rita P. Laude² and Maria Corazon A. De Ungria^{1*} 

The «Bad» DNA



Tracce/Touch DNA (sudore, cappello, cellulare, occhiali da sole)

Spesso è il risultato del DNA mixture di diverse persone;

In genere, è 'Bad DNA' quando viene toccato brevemente un oggetto: pochissime tracce di DNA

The «Bad» DNA

Illustration of possible (a) primary, (b) secondary and (c) tertiary DNA transfer.

(a) Primary transfer



(b) Secondary transfer



(c) Tertiary transfer



The «Bad» DNA: il caso di OJ Simpson

RFLP



Match inconfutabile con il test del DNA fingerprinting,ma. . .

La difesa vince grazie all'accusa di cross-contaminazione del materiale biologico, chiede il suo proscioglimento

Poca esperienza del corpo di polizia (procedure di repertazione)

Reperti sporchi di sangue, ancora umidi, lasciati in macchina al sole per diverse ore → degradazione del DNA → prove genetiche non determinanti

The «Bad» DNA: il caso di OJ Simpson

Samples/Location (Date Collected)	Number of Samples Collected	DNA Match	Defense Challenge
Blood drops at Nicole Brown's home (13 June)	5 drops leading away from house	Simpson	Heavy degradation of the 'real' killer's DNA; tampering with evidence 'swatches' sample contamination during laboratory investigation
Stains on rear gate at Brown's home (3 July)	3 stains	Simpson	Samples planted by rogue police officers prior to collection
Stains in O.J.'s Bronco (14 June)	5 stains around vehicle; bloody footprint; stain on center console	Simpson in 5 stains; Brown in footprint; Simpson/Goldman mixture on console	Simpson's DNA present for reasons unrelated to the crime; Detective Mark Fuhrman planted the blood footprint; laboratory controls failed on console mixture analysis
Second collection of stains in O.J.'s Bronco (26 August)	3 stains	Mixture of Simpson, Brown, and Goldman	Blood planted in the vehicle between the crime and the collection
Stains at Simpson's home (13 June)	2 drops in driveway, 1 in foyer, 1 in master bedroom	Simpson	Simpson bled at these locations for reasons unrelated to the crime
Socks found in Simpson's bedroom (13 June)	Multiple stains	Simpson and Brown	Blood planted after the socks were collected
Bloody glove found on the grounds of Simpson's home (13 June)	15 stains identified	Goldman, Simpson, and Brown alone or as mixture	Glove was removed from murder scene and planted by Detective Mark Fuhrman; Simpson's DNA was present because of laboratory contamination

Sources:

Levy, H. (1996). O.J. Simpson: What the blood really showed. In H. Levy (Ed.), *And the blood cried out* (pp. 157–188). New York: Basic Books.

Scherzinger, C. A., et al. (1999). A systematic analysis of PCR contamination. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), 1042–1045.

Sims, G., et al. (1995). The analysis of serological evidence by the California Department of Justice DNA Laboratory in the case of *People v.*

Il caso di OJ Simpson



Famoso giocatore di baseball

2008: condannato a 33 anni di carcere (dei quali 9 senza libertà vigilata) per rapina a mano armata e sequestro di persona;

è stato liberato il primo ottobre 2017 ed è ora in regime di libertà vigilata

The «Ugly» DNA



Urine, feci, vomito, ecc.

Campioni di DNA non testati di routine

- Feci: tamponare l'esterno;
- Vomito: tamponare
- Urine: chiama il laboratorio!

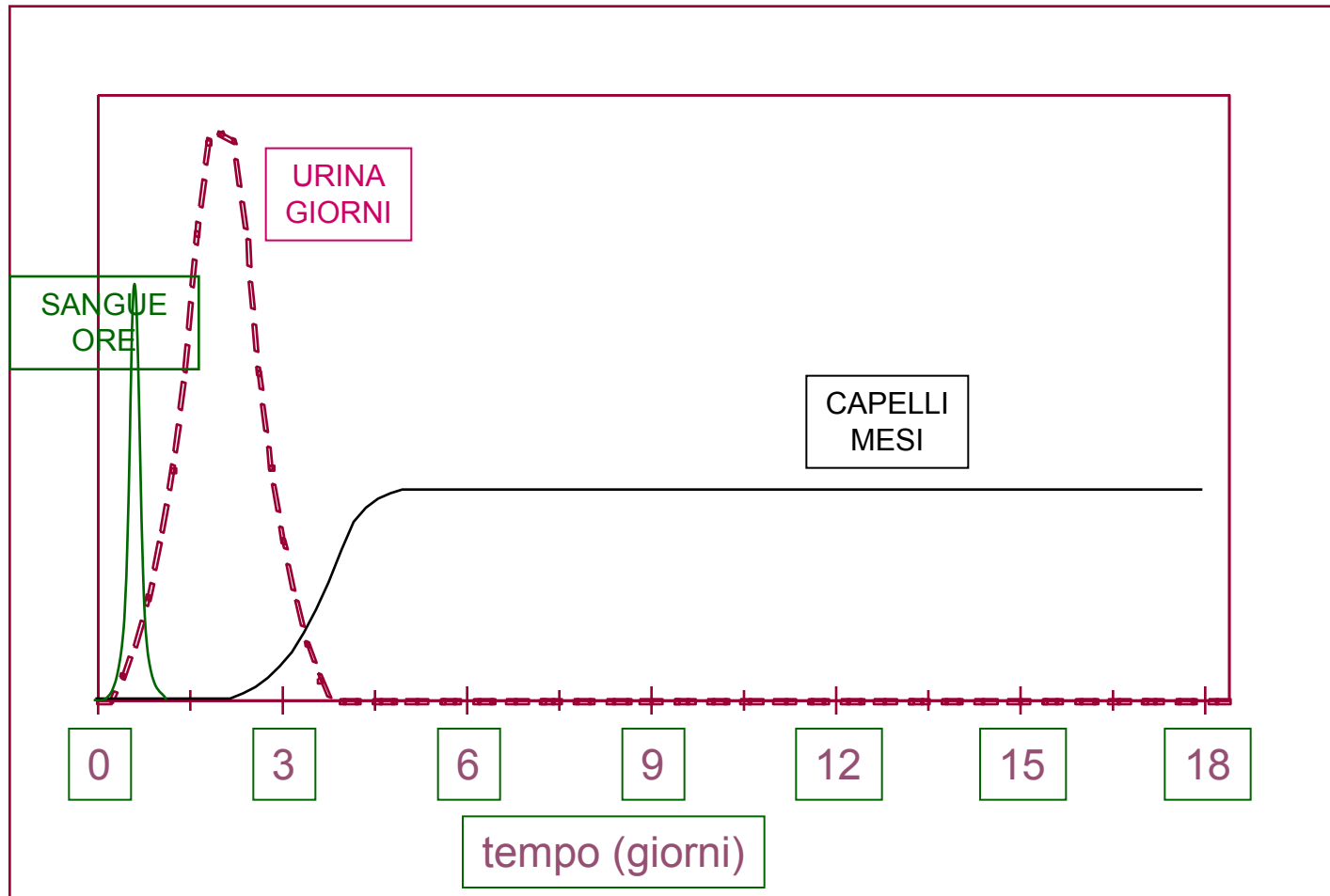


Scelta della Matrice Biologica

In rapporto all'informazione che si vuole ottenere:

- ✓ Diagnosi di **attualità** d'uso: sangue, saliva
- ✓ Diagnosi di **uso recente**: urina, sudore
- ✓ Diagnosi di **uso/esposizione abituale**: capelli, peli, unghie
- ✓ Diagnosi di avvelenamento (sangue, urine, organi)

Scelta della Matrice Biologica



Estrazione del DNA antico (aDNA)



Estrazione del DNA antico (aDNA)

Ogni DNA estratto da fossili (resti di organismi conservati da 10.000 anni o più) o da subfossili (resti più recenti di 10.000 anni) di specie oggi estinte, è DNA antico.

Si considera come aDNA solo il DNA endogeno estratto da resti (○) di almeno 50 anni: questa definizione si basa, grosso modo, sul tempo di una generazione umana.

(○) resti di materiali biologici (ossa, denti, coproliti, corpi mummificati, sangue coagulato...)→ DNA



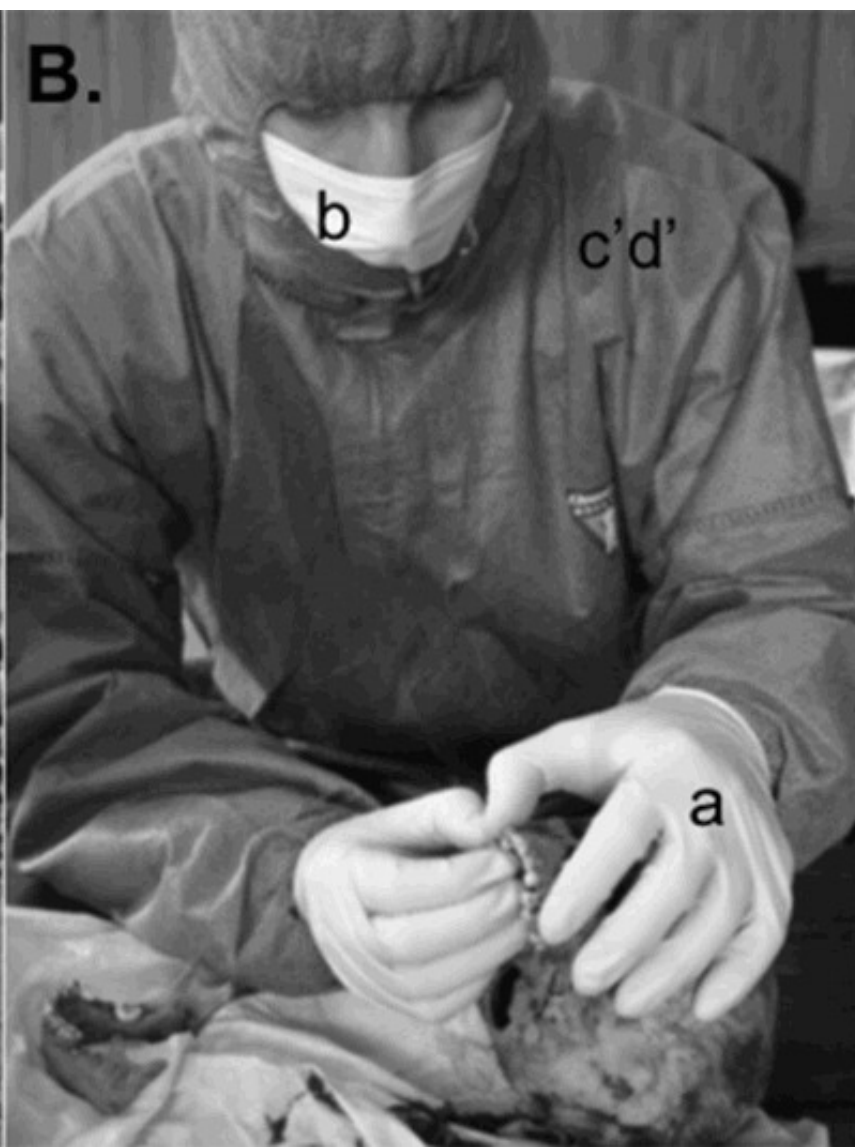
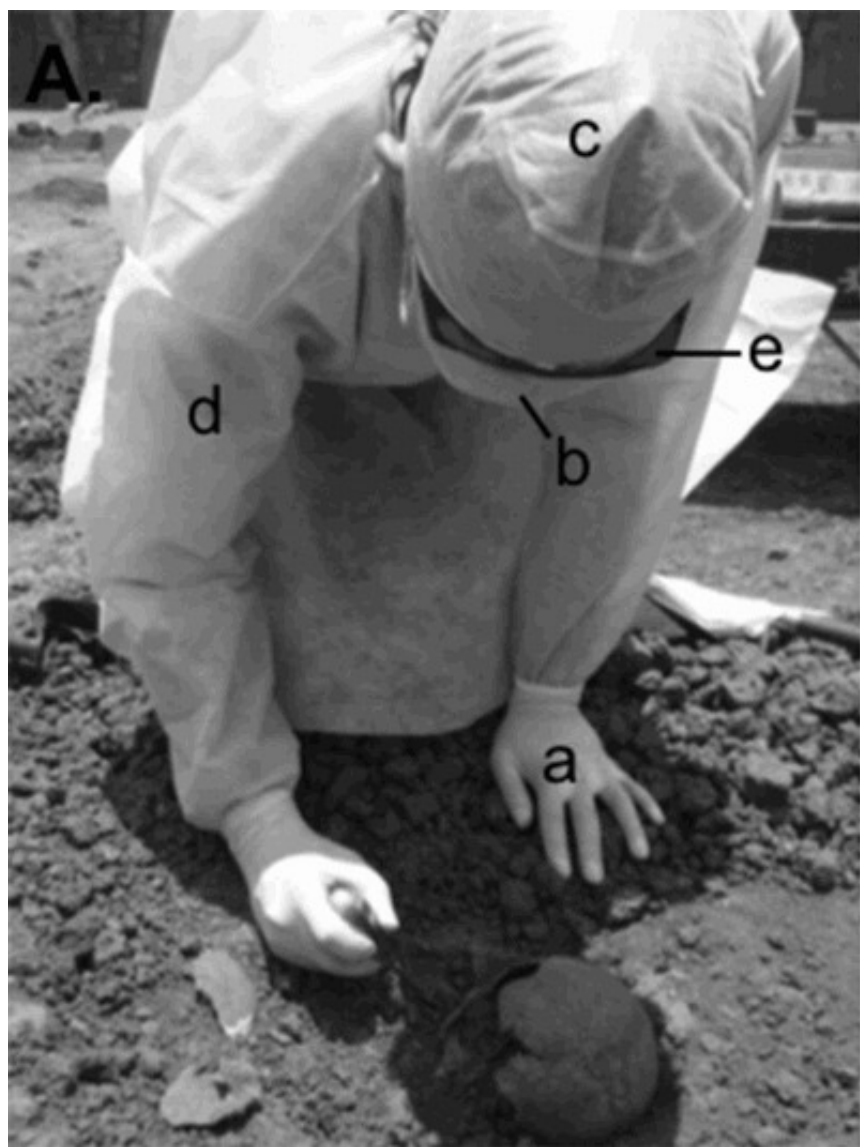
Estrazione del DNA antico (aDNA)

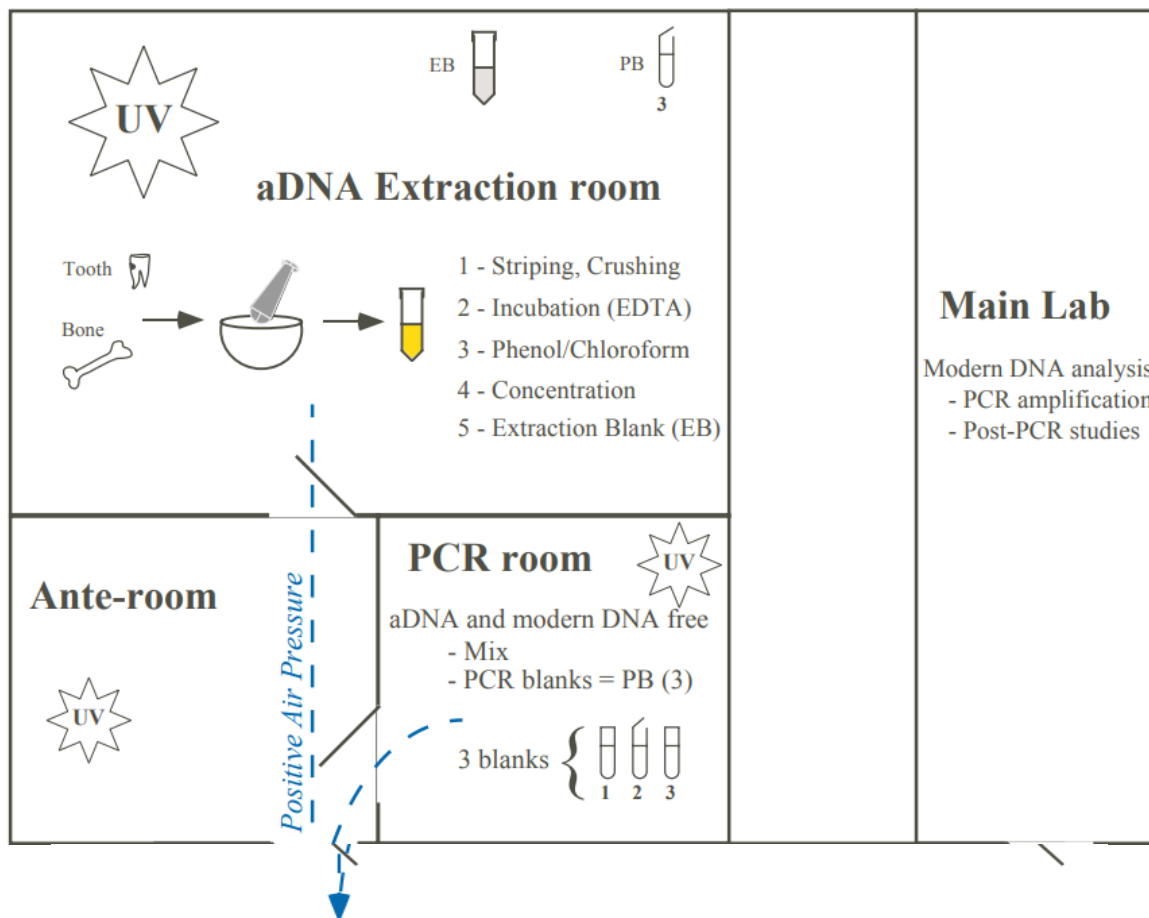
Le ossa ricche di tessuto compatto sono preferibili per uno studio molecolare, inoltre l'estrazione di DNA comporta la distruzione, seppur minima, di materiale osseo per cui è bene scegliere parti dello scheletro (**coste o falangi**) di scarsa importanza per lo studio antropometrico.

Raccomandazione: lavorare su reperti immediatamente provenienti dallo scavo e conservati sterilmente in assenza di umidità è senz'altro da sottoscrivere ma sicuramente di difficile attuazione.

Prelevato il campione e portato nel laboratorio per attuare l'analisi del DNA: mantenere sotto controllo i parametri ambientali dei locali stessi, onde evitare di provocare azioni che favoriscano gli agenti degradanti del contenuto biologico.

Evitare il problema delle contaminazioni con DNA esogeno.





EB = Extraction Blank



Extraction Blank

test extract reagents (EDTA, PK, Sarcosyl)

3 PB = 3 PCR blanks



1 PCR reagents only

2 PCR reagents only, open in PCR room

3 PCR reagents only, open in extraction room

test PCR reagents

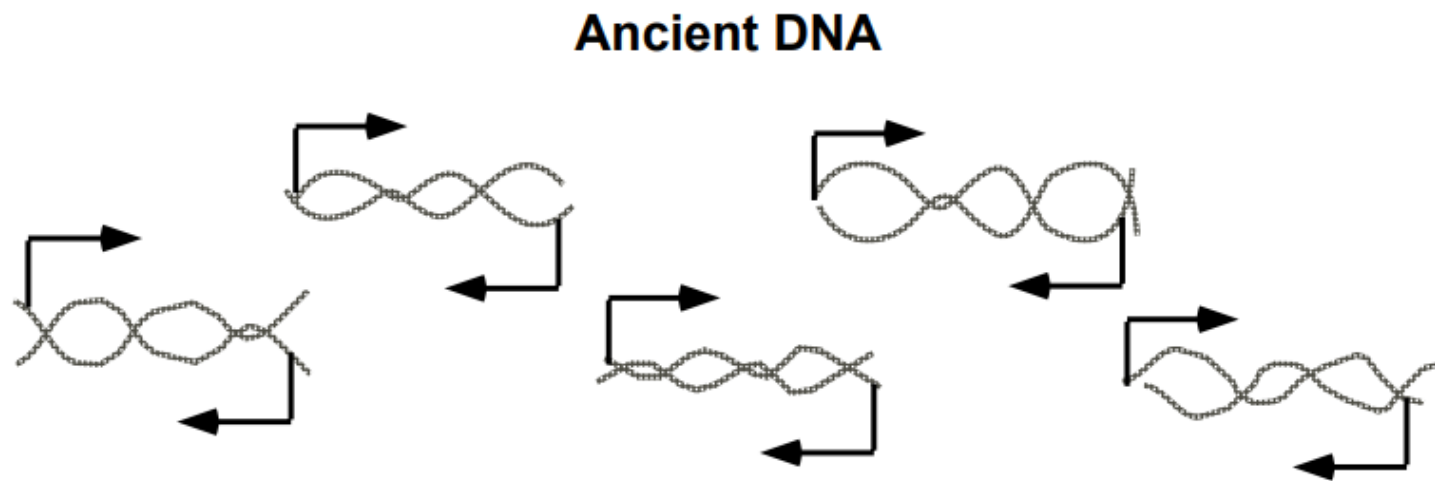
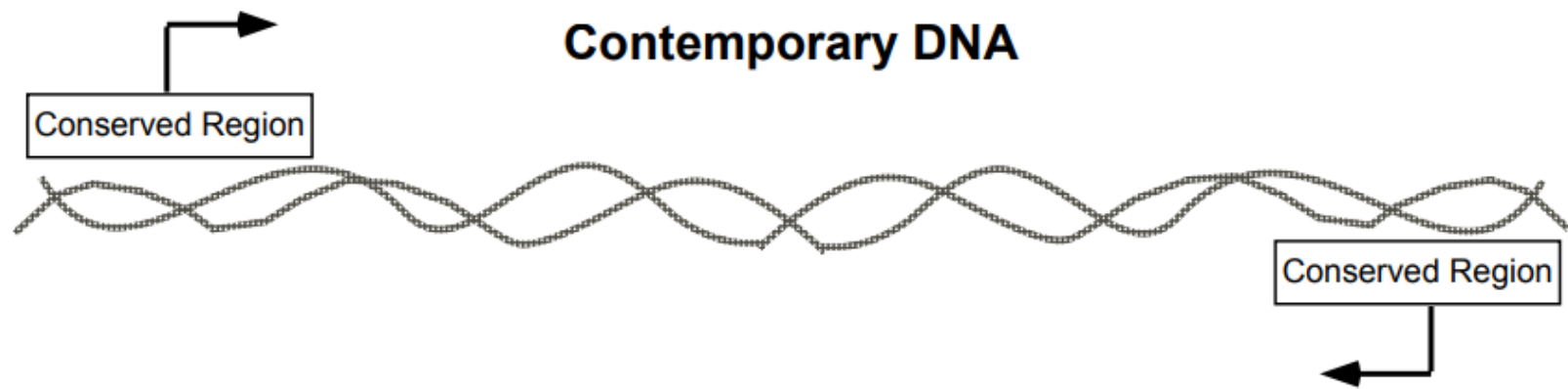
PCR room air test (aerosol)

Extraction room air test (aerosol)



Estrazione del DNA antico (aDNA)

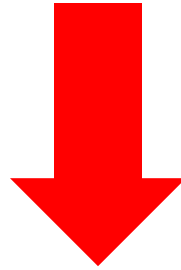
- 1) aree di lavoro devono essere fisicamente isolate e dedicate solo allo studio dell'aDNA;
- 2) effettuare estrazioni multiple (controlli “bianchi”) e negative (amplificazioni di controllo);
- 3) ottenere gli stessi risultati, ripetendo le analisi a partire dagli stessi estratti di DNA (o da estratti differenti dello stesso campione);
- 4) PCR di piccoli frammenti (max 200 bp), perché partendo da poche molecole di DNA danneggiate e frammentate, può verificarsi l'amplificazione preferenziale di frammenti di DNA più lunghi e integri;
- 5) clonaggio degli amplificati, nel caso di contaminazioni intervenute nel corso del tempo;
- 6) riproducibilità dell'intera fase sperimentale da un altro operatore e in un altro laboratorio



Monitoraggio genetico **NON** invasivo



Monitoraggio genetico **NON** invasivo

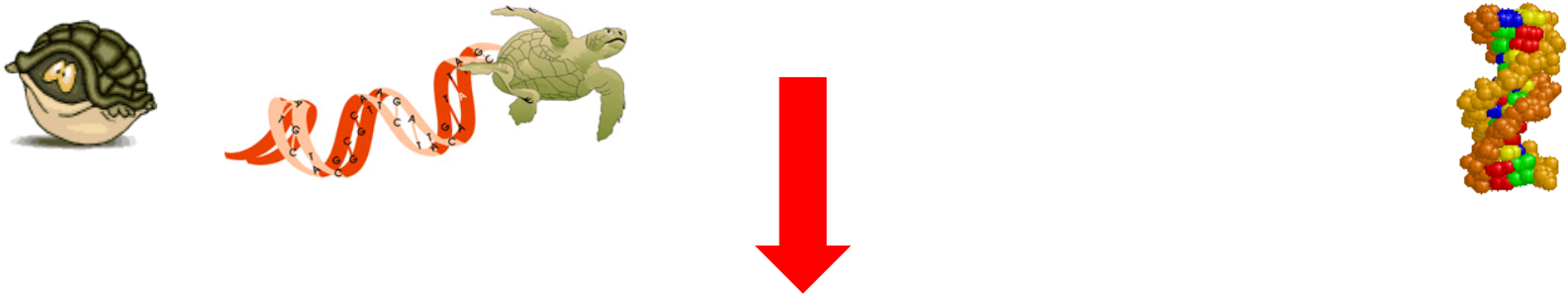


NON ARRECARRE DISTURBO:

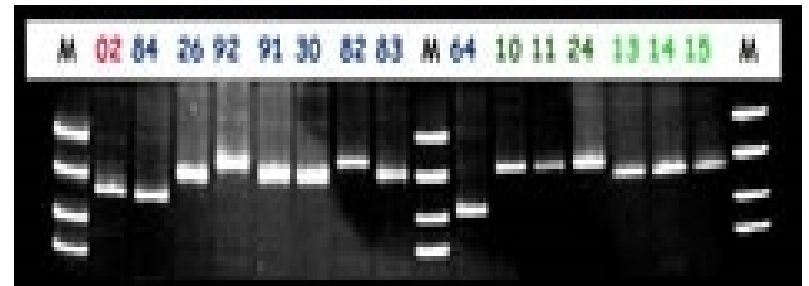
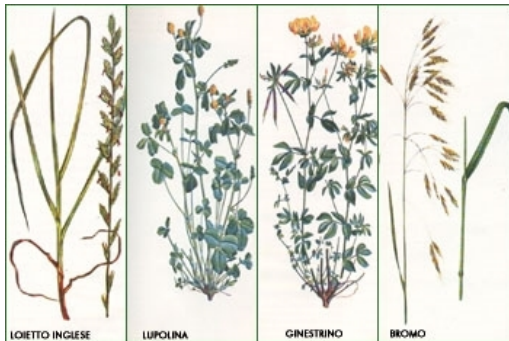
ESTRARRE IL DNA DAI CAMPIONI BIOLOGICI CHE LASCIANO SUL CAMPO (FECI, PELI, PENNE, TRACCE DI SANGUE ECC...)

Monitoraggio genetico NON invasivo

Estrazione DNA → analisi di marcatori molecolari



SPECIE, SESSO, GENOTIPO INDIVIDUALE



Forensic DNA Extraction Methods



Forensic DNA Extraction Methods

Ci sono diversi metodi per estrarre il DNA, che possono essere classificati in:

- 1) Metodi che rilasciano semplicemente il DNA senza purificazione
- 2) Metodi che sia rilasciano che purificano il DNA.

Entrambi i metodi prevedono uno o più steps

Forensic DNA Extraction Methods

Ci sono diversi metodi per estrarre il DNA, che possono essere classificati in:

- 1) Metodi che rilasciano semplicemente il DNA senza purificazione
- 2) Metodi che sia rilasciano che purificano il DNA.

Entrambi i metodi prevedono uno o più steps

LISI CELLULARE

→ fare fuoriuscire il contenuto nucleare

Vengono utilizzati detergenti e calore

→ rilascio del DNA dagli istoni e
inattivazione delle DNAsi (proteinase K ed EDTA)



LISI CELLULARE

1. **LISI** (ovvero rompere) della parete e della membrana cellulare → fare fuoriuscire il contenuto nucleare
2. **TRATTARE CON PK** → separare il DNA dalle proteine istoniche cui è associato
3. **PRECIPITARE IL DNA:** vengono utilizzati degli alcoli, quali ad es isopropanolo ed etanolo, nei quali il DNA è insolubile

LISI CELLULARE

1) METODI NON MECCANICI	
a) Shock osmotico	• Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
b) Congelamento/scongelamento	• Tessuti animali molli, alcuni batteri
c) Enzimi litici	• Cellule animali e vegetali
2) METODI MECCANICI	
a) Pestello e mortaio	• Tessuti resistenti
b) Sfere di vetro	• Batteri e funghi
c) Omogenizzatore a motore	• Tessuti vegetali e animali
d) Omogenizzatore a mano	• Tessuti molli delicati
g) Ultrasonificazione	• Microorganismi

LISI CELLULARE

1) METODI NON MECCANICI	
a) Shock osmotico	• Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
b) Congelamento/scongelamento	• Tessuti animali molli, alcuni batteri
c) Enzimi litici	• Cellule animali e vegetali
2) METODI MECCANICI	
a) Pestello e mortaio	• Tessuti resistenti
b) Sfere di vetro	• Batteri e funghi
c) Omogenizzatore a motore	• Tessuti vegetali e animali
d) Omogenizzatore a mano	• Tessuti molli delicati
g) Ultrasonificazione	• Microorganismi

LISI CELLULARE MECCANICA

Tissue lyser

- La lisi del campione può essere effettuata a secco o con buffer di estrazione
- La distruzione del campione avviene grazie ad una biglia di acciaio e a movimenti oscillatori ad alta frequenza
- Tempo variabile a seconda della matrice di partenza
- La lisi deve essere seguita da uno step di centrifugazione

DISRUPTOR GENIE® *Cell Disruptor*

**NEW
IMPROVED
DESIGN ON
ALL MODELS**



ANALOG

**Unique
multi-directional
action for
simultaneous
agitation and
vortexing.**

New!



DIGITAL

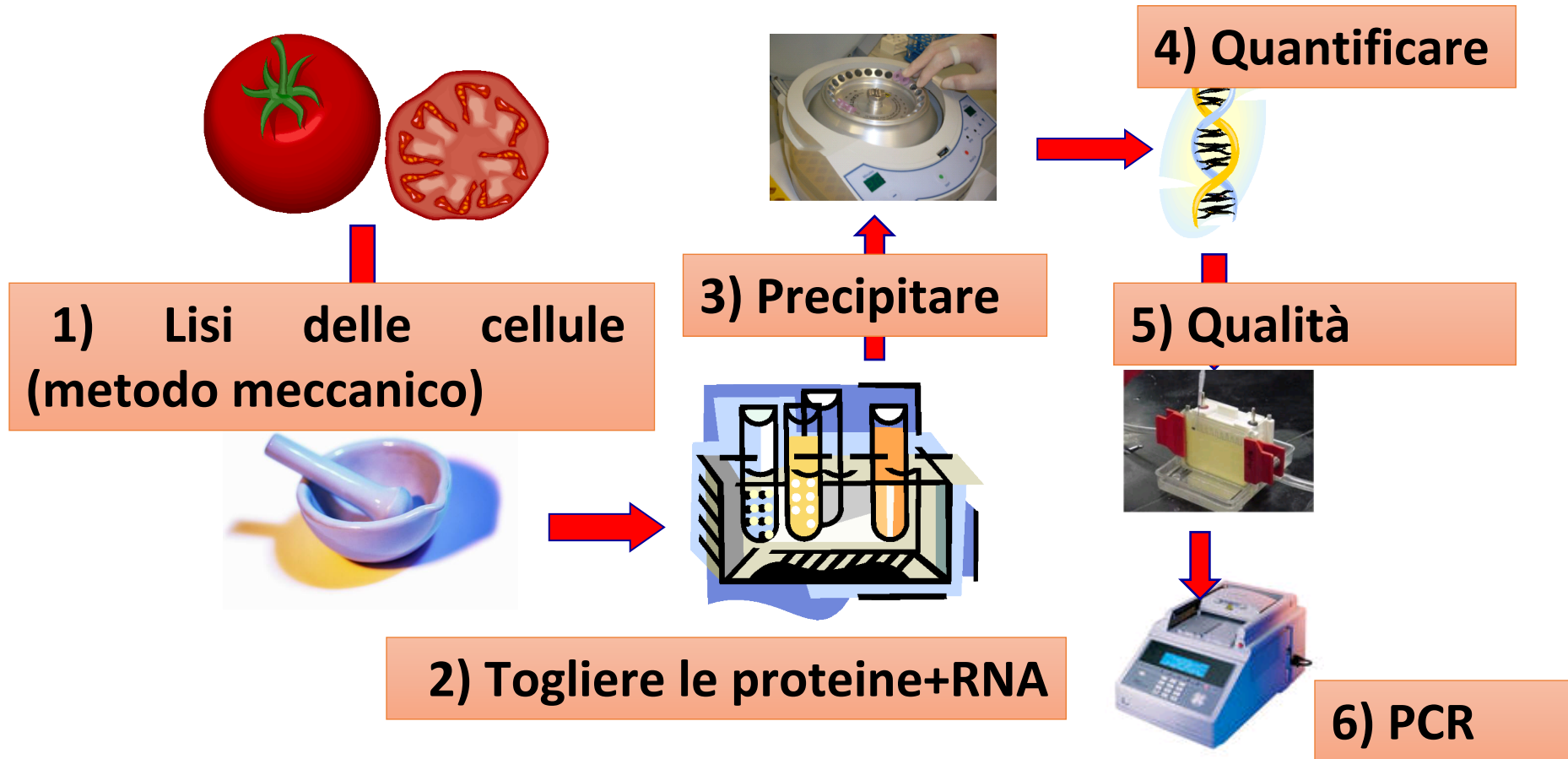


Disruptor Beads™

U.S. Pats. 5,707,861
4,781,487



Es di altra LISI CELLULARE MECCANICA



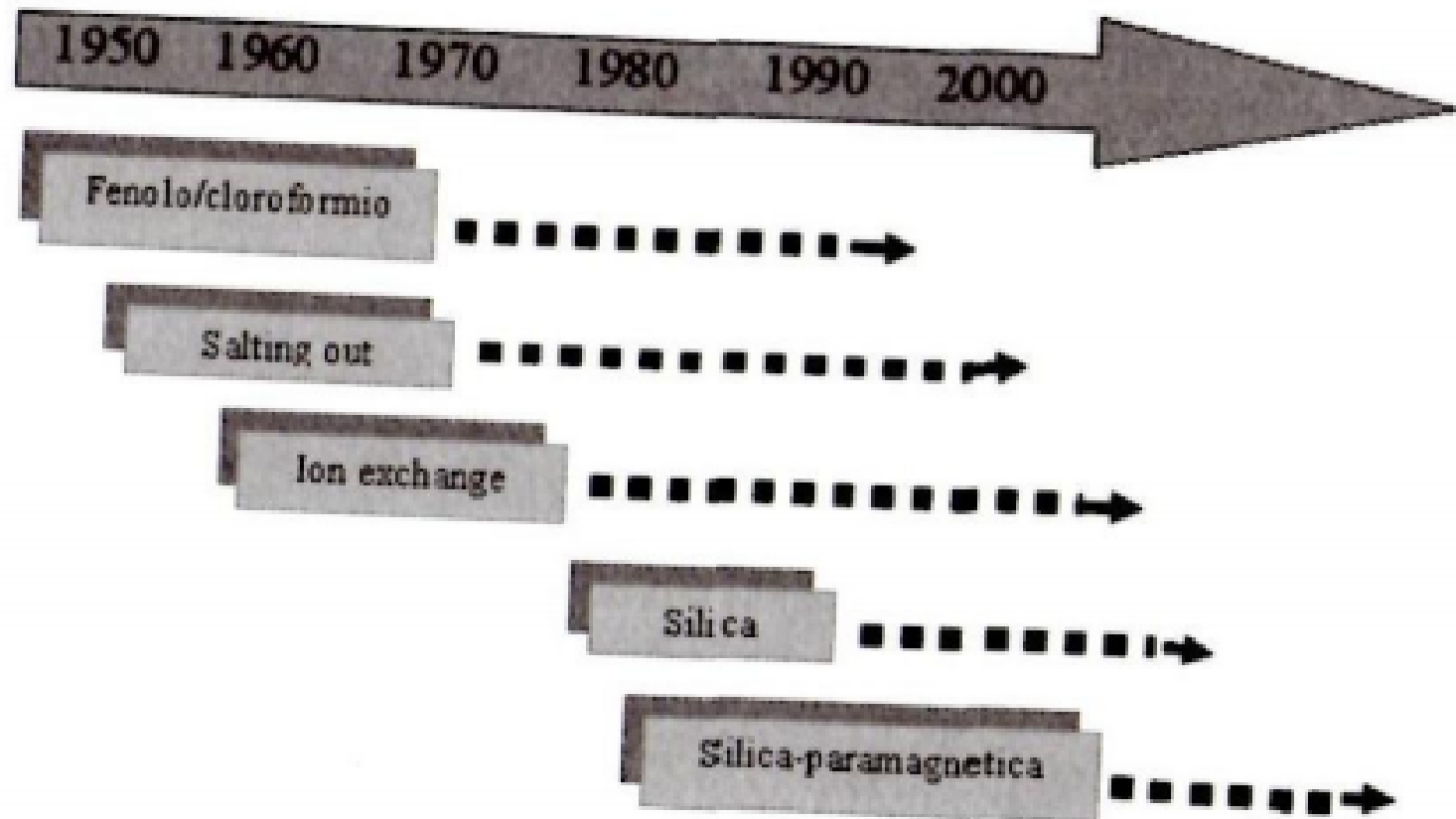
Forensic DNA Extraction Methods

Ci sono diversi metodi per estrarre il DNA, che possono essere classificati in:

- 1) Metodi che rilasciano semplicemente il DNA senza purificazione
- 2) Metodi che sia rilasciano che purificano il DNA.

Entrambi i metodi prevedono uno o più steps

LISI e PURIFICAZIONE DNA



LISI e PURIFICAZIONE DNA

DNA EXTRACTION METHODS IN FORENSIC ANALYSIS

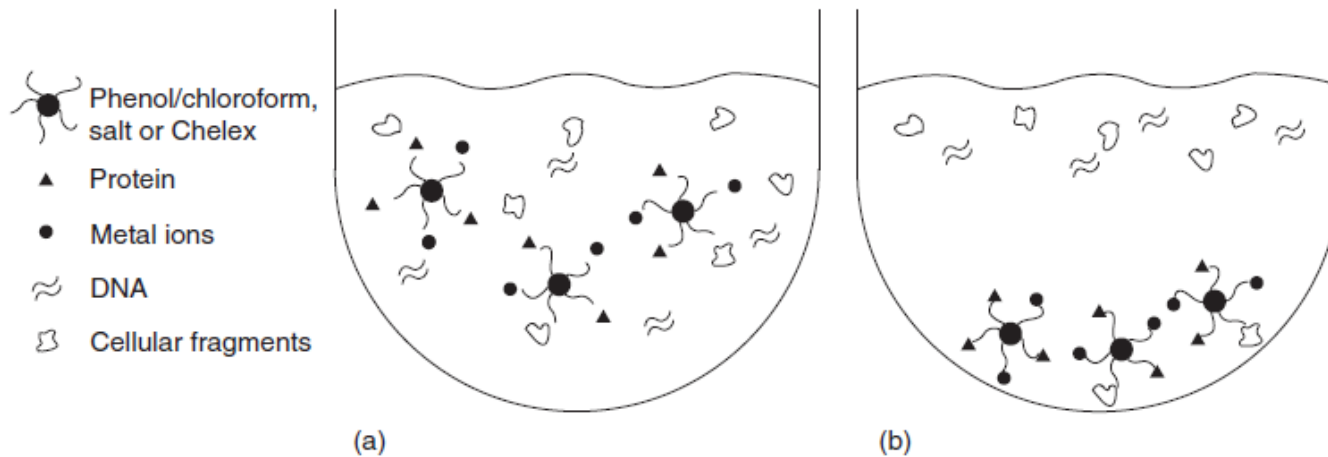
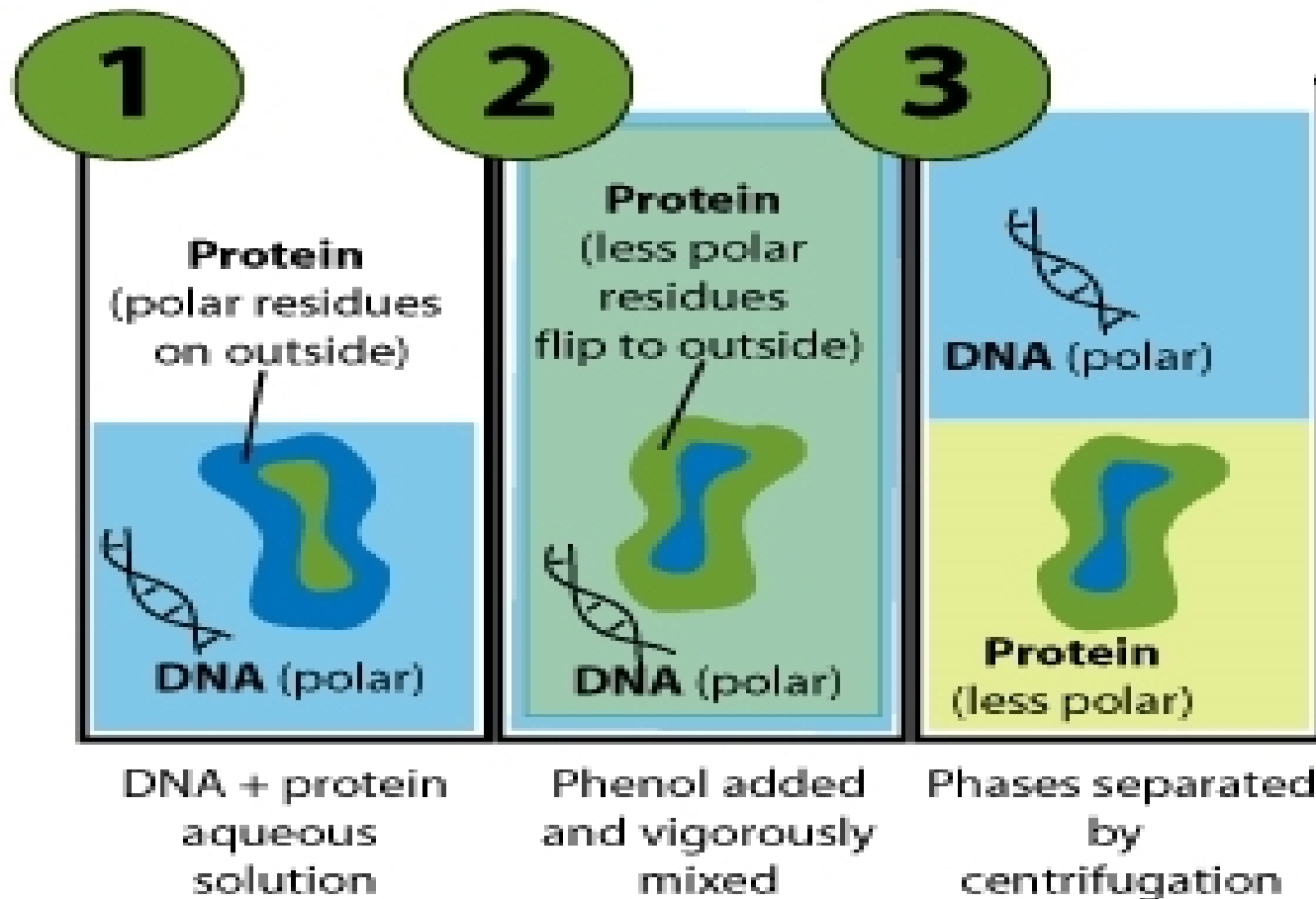


Figure 1 Mechanisms of nonaffinity methods where (a) the extracting agent (phenol/chloroform, salt or Chelex[®] resin) pull away protein, metal ions, and components of cell walls, leaving (b) DNA in solution.

Genomic DNA isolation: phenol extraction



Genomic DNA isolation: phenol extraction

1:1 **phenol** : **chloroform**

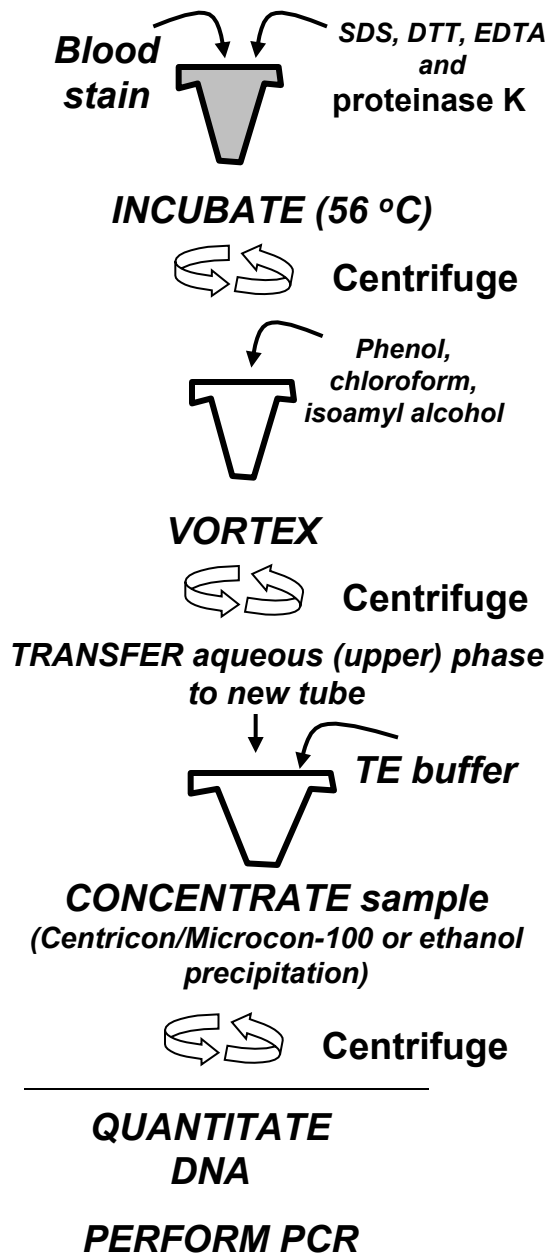
or

25:24:1 **phenol** : **chloroform** : **isoamyl alcohol**

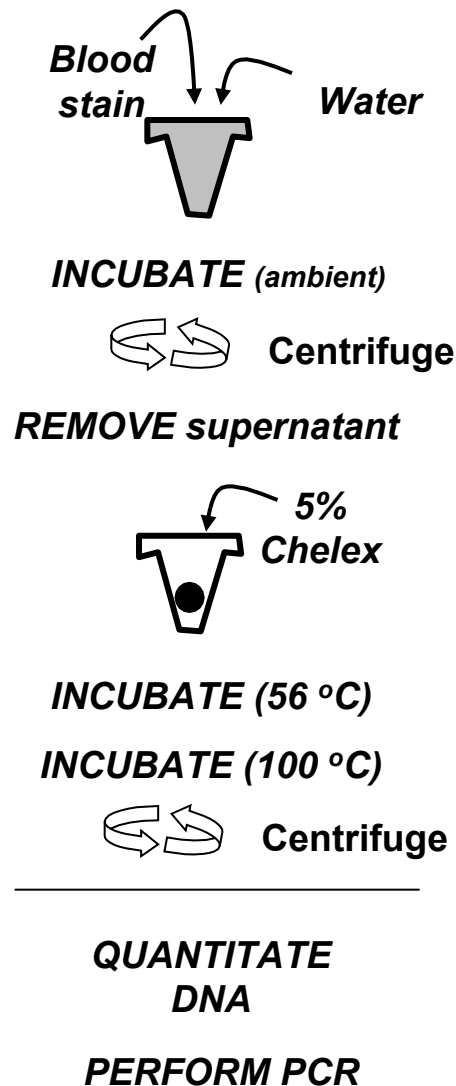
- **Phenol**: denatures proteins, precipitates form at interface between aqueous and organic layer
- **Chloroform**: increases density of organic layer
- **Isoamyl alcohol**: prevents foaming

Genomic DNA is isolated as pieces up to 1 Mbp!

ORGANICA



CHELEX



FTA Paper

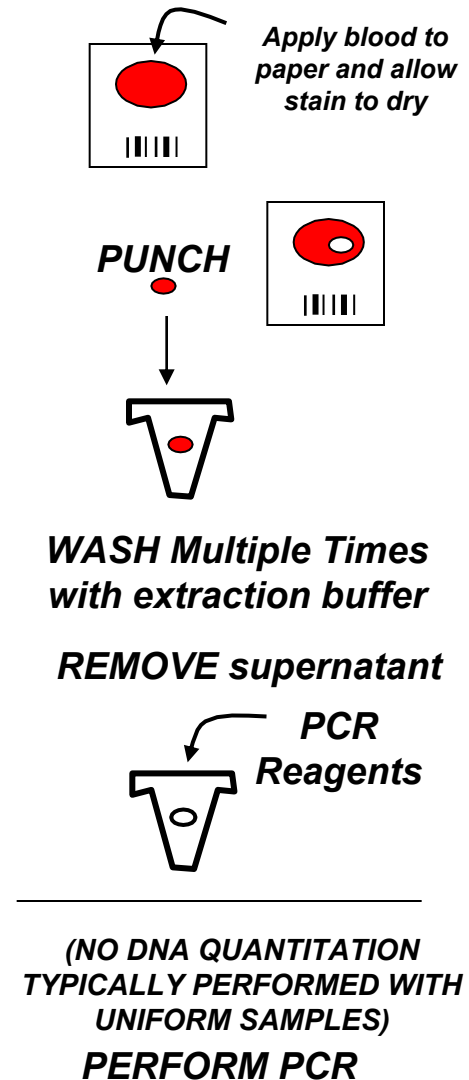


Figure 3.1, J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

Chelex 100 (resina a scambio ionico)

DNA EXTRACTION AND QUANTIFICATION

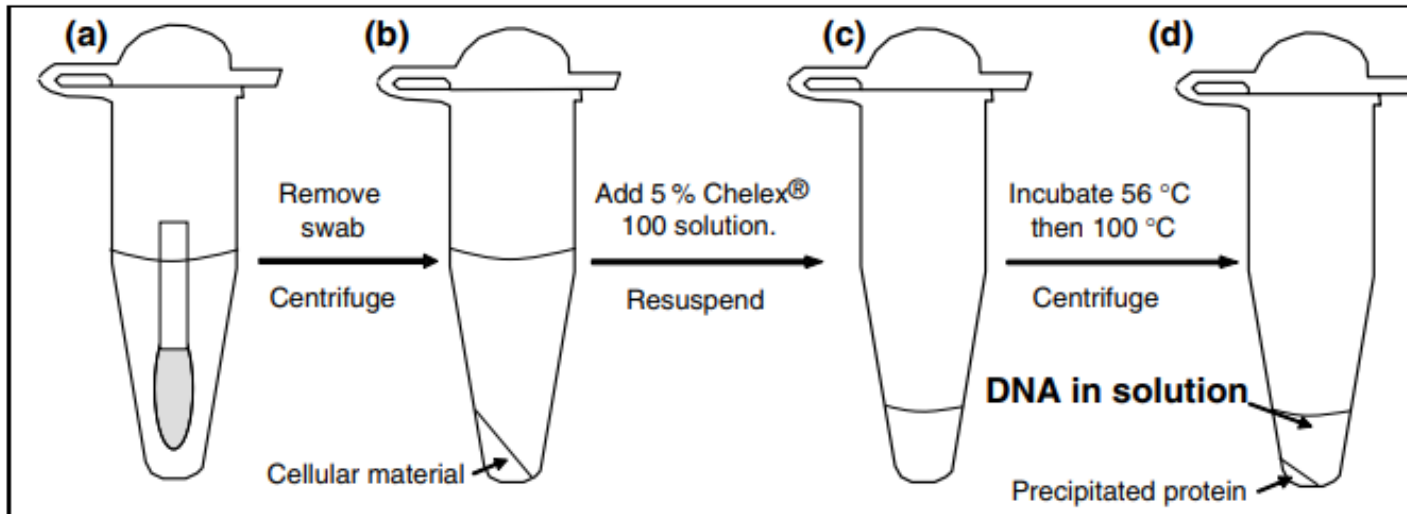


Figure 4.1 The Chelex[®] 100 extraction is quick and easy to perform. (a) The cellular material is added to 1 ml of TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris: pH 8.0) and incubated at room temperature for 10–15 minutes. (b) The tube is centrifuged at high speed to pellet the cellular material and the supernatant is removed. (c) the pellet of cellular material is resuspended in 5 % Chelex[®], the tube is incubated at 56 °C for 15–30 minutes and then placed in a boiling water bath for 8 minutes. The tube is centrifuged at high speed for 2–3 minutes to pellet precipitated protein. (d) The supernatant contains the DNA and can be used directly in a PCR

LISI e PURIFICAZIONE DNA

Purification of DNA from crude cell lysates by selective binding to a support material.

Support Materials

- Silica
- Anion-exchange resin

Advantages

- Speed and convenience
- No organic solvents
- Amenable to automation/miniaturization

Disadvantage

- DNA fragmentation

LISI e PURIFICAZIONE DNA

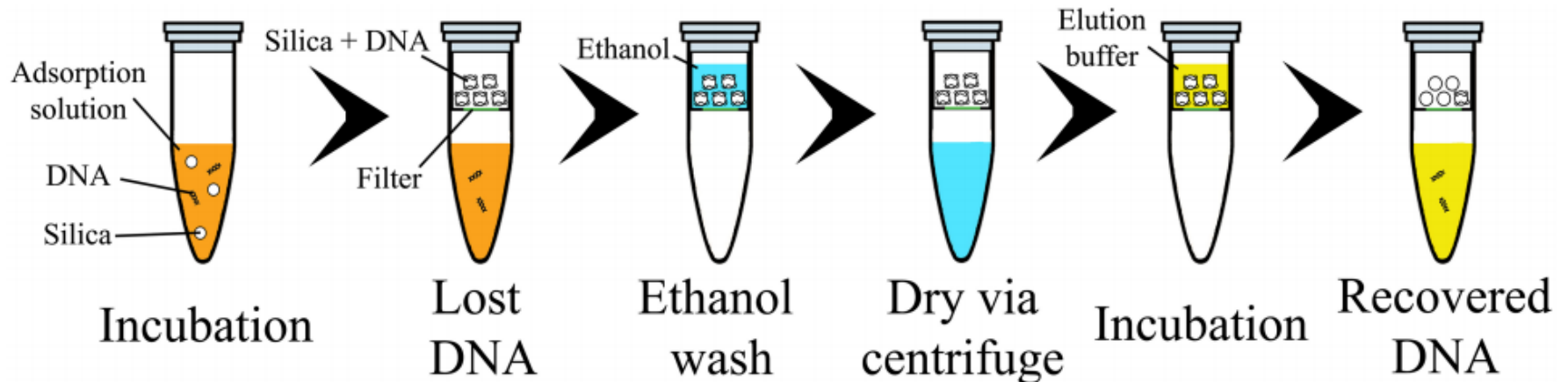


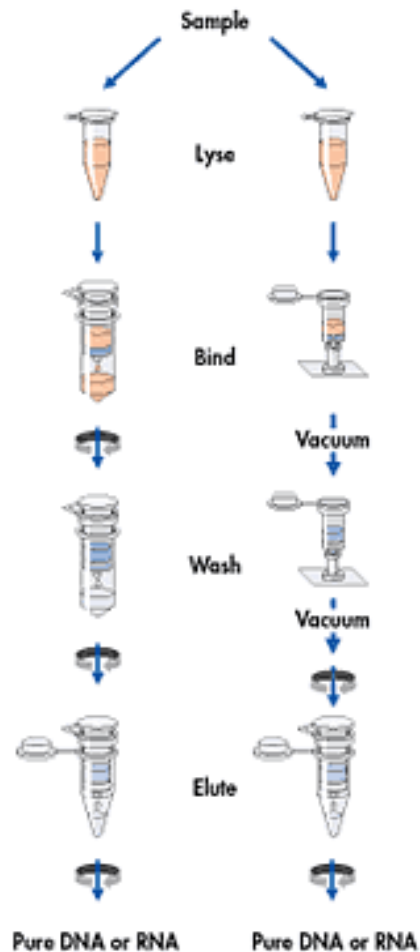
Fig 1. Schematic of general protocol. Silica, adsorption solution, and DNA were combined in a microcentrifuge tube. This solution was incubated for 1 hour in an agitated state to promote mixing. The silica particles and any DNA adsorbed onto them were separated from solution using a filter. The supernatant was analyzed to determine the 'Lost DNA' (DNA amount not adsorbed after incubation). The particles were subsequently washed with 70% ethanol and dried. The elution buffer was then added and incubated for 5 min before it was also collected to determine the 'Recovered DNA' (DNA amount eluted from the silica surface).

LISI e PURIFICAZIONE DNA

kit commerciale:

Procedura molto rapida 200 µl di saliva, sangue intero 3 µg di DNA

QIAamp Spin Column Procedure
in microfuges on vacuum manifolds



- Breve incubazione in buffer di lisi con pK
- Passaggio su colonnine composte da una membrana di gel di silice (cromatografia)
- Il DNA viene assorbito (pH 7.5) sulla membrana dopo una breve centrifugazione (con sali caotropici)
- Rimozione delle proteine digerite e altri contaminanti con buffer di lavaggio
- Centrifugazione o utilizzo di collettori a vuoto
- Eluizione del DNA

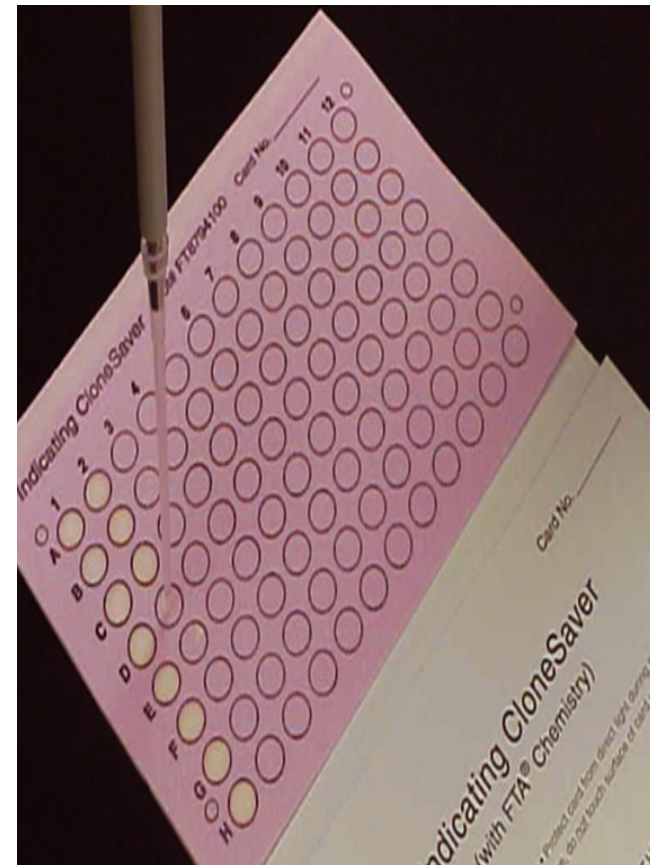
Risultati identici dopo 15 anni di conservazione a °T ambiente!

L'FTA è un trattamento chimico su carta da filtro Whatman che consente una rapida estrazione/conservazione del DNA.

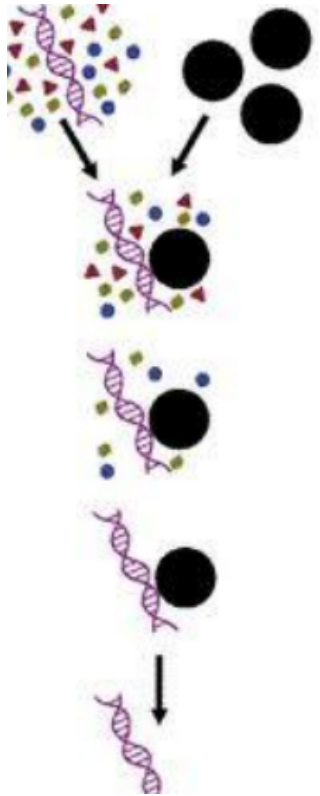
È costituito da carta filtro impregnata con un mix esclusivo di sostanze chimiche che servono a lisare le cellule, prevenire la crescita dei batteri e proteggere DNA nel campione.

Possono essere utilizzati con qualsiasi traccia che deve essere semplicemente applicato direttamente alla carta

FTA



LISI e PURIFICAZIONE DNA



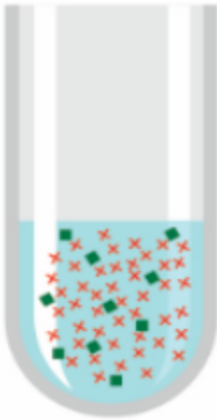
Biglie paramagnetiche:

- 1) nucleo superparamagnetico,
- 2) rivestimento, che previene l'aggregazione irreversibile delle particelle magnetiche

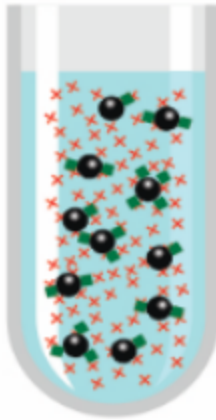
Gli acidi nucleici si legheranno alle particelle magnetiche, mentre i contaminanti (proteine, polisaccaridi) non lo faranno.

LISI e PURIFICAZIONE DNA

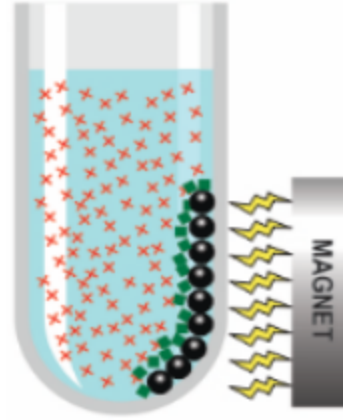
Campione di partenza



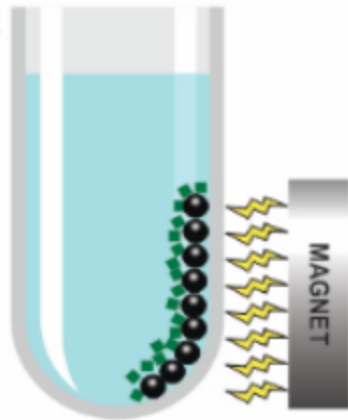
Biglie legate al DNA



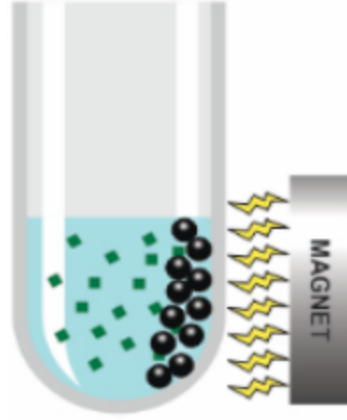
Separazione biglie + DNA da impurità



Lavaggio in EtOH



Rilascio del DNA
in acqua



Campione finale
purificato



Estrazione con Biglie paramagnetiche

Non richiede centrifugazione, nè qPCR, non vengono utilizzati reagenti pericolosi, nè tediosi steps di lavaggio ; non vengono utilizzate colonne costose.

Pro:

- Procedura molto veloce e automatizzata
- DNA altamente purificato
- Bassa probabilità di contaminazione

Contro:

- Costoso
- Resa più bassa di DNA $\simeq$ 5-20 ng/ μ l
- DNA più frammentato

Automated Extraction Platforms Utilizing Magnetic Beads

Benefits to automated extraction include reduced time, limited analyst manipulation, multiple samples processed at once, and higher throughput.

Downsides to automated extraction include increased cost per sample and significant time necessary for validation of new technology in the laboratory.



QIAgen QIA Symphony



Promega Maxwell 16



ABI Automate



Le prove biologiche possono contenere anche DNA non umano (materiale batterico, fungino, vegetale o animale) può anche essere presente nel DNA totale recuperato.

DNA Purification mini spin columns - 50 columns



DNA estratto:

1) Purezza da contaminanti proteici ed estrazione

2) QUALITA'

DNA estratto:

1) Purezza da contaminanti proteici ed estrazione

2) QUALITA'

DNA estratto: metodi per misurarne la quantità

- (A) STIMA DELLA QUANTITA' E DIMENSIONE SU GEL DI AGAROSIO
- (B) STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE LO
SPETTOFOTOMETRO
- (C) STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE IL FLUORIMETRO
- (D) MISURA DELLA QUANTITA' CON LA qPCR

STIMA QUANTITA' E DIMENSIONE SU GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi (gel di agarosio) è un altro possibile metodo per stimare la concentrazione e la qualità del DNA estratto.

Questo metodo si basa sull'uso di un ladder di DNA, i cui frammenti sono di quantità nota.

Per stimare la quantità di DNA presente in un campione viene effettuato un confronto tra l'intensità della fluorescenza emessa dalla banda in un campione a una banda nel ladder di DNA.

STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE LO SPETTOFOTOMETRO

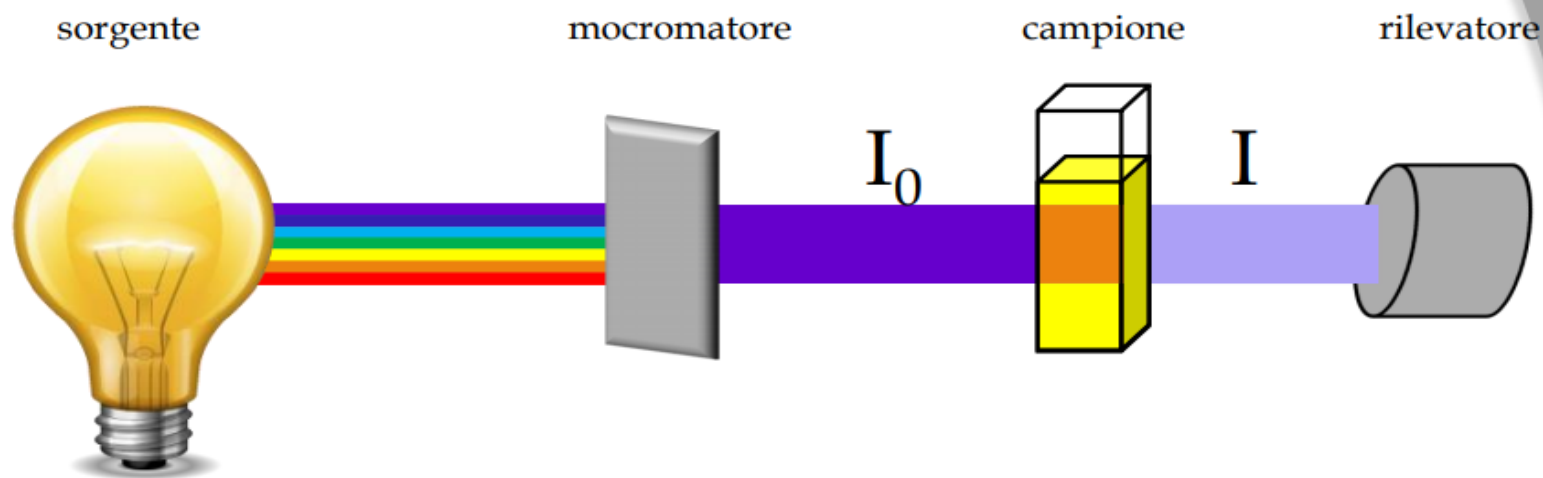
Tutte le molecole assorbono energia radiante a una λ specifica, compresi gli acidi nucleici, che assorbono energia radiante nell'intervallo ultravioletto.

Pertanto, la concentrazione di acido nucleico può essere quantificata direttamente in soluzioni acquose utilizzando uno spettrofotometro per misurare la quantità di luce ultravioletta assorbita dal campione.

La concentrazione di acido nucleico può quindi essere calcolata usando la legge Beer-Lambert, che descrive una relazione lineare tra assorbanza e concentrazione della macromolecola target usando la seguente equazione:

STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE LO SPETTOFOTOMETRO

Relazione tra concentrazione ed assorbimento di una sostanza ad una certa lunghezza d'onda



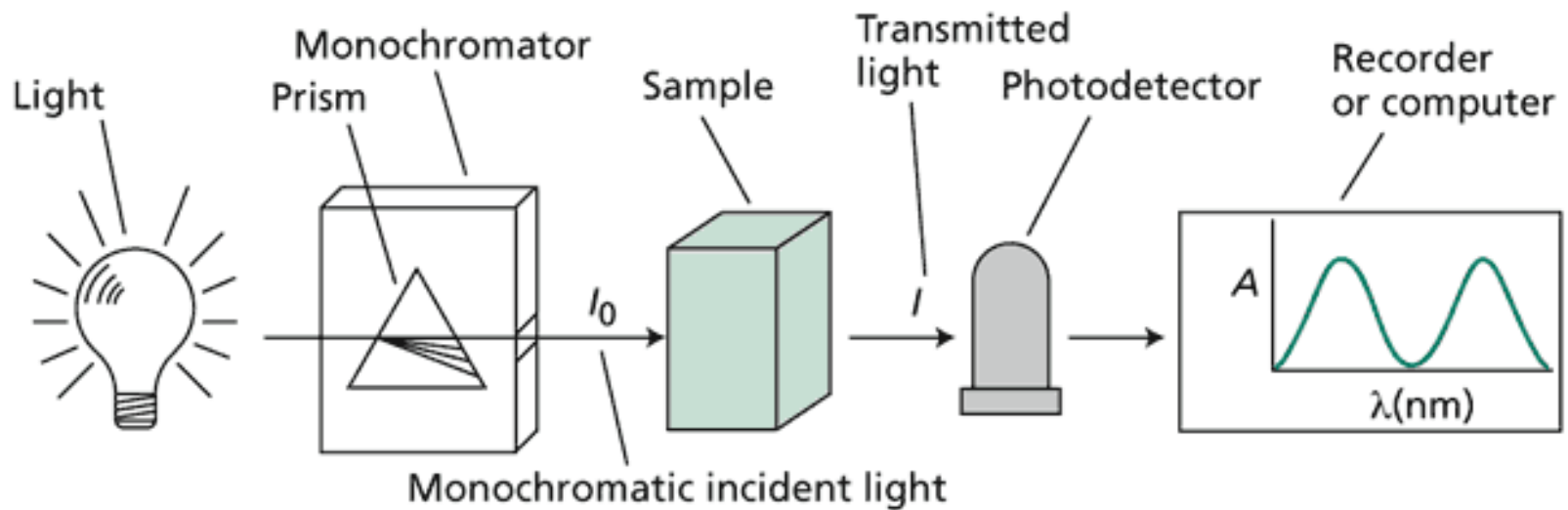
Legge di Lambert-Beer: **$A = OD = \epsilon lc$**

c = concentrazione Molare (moli/L) della sostanza che assorbe la luce.

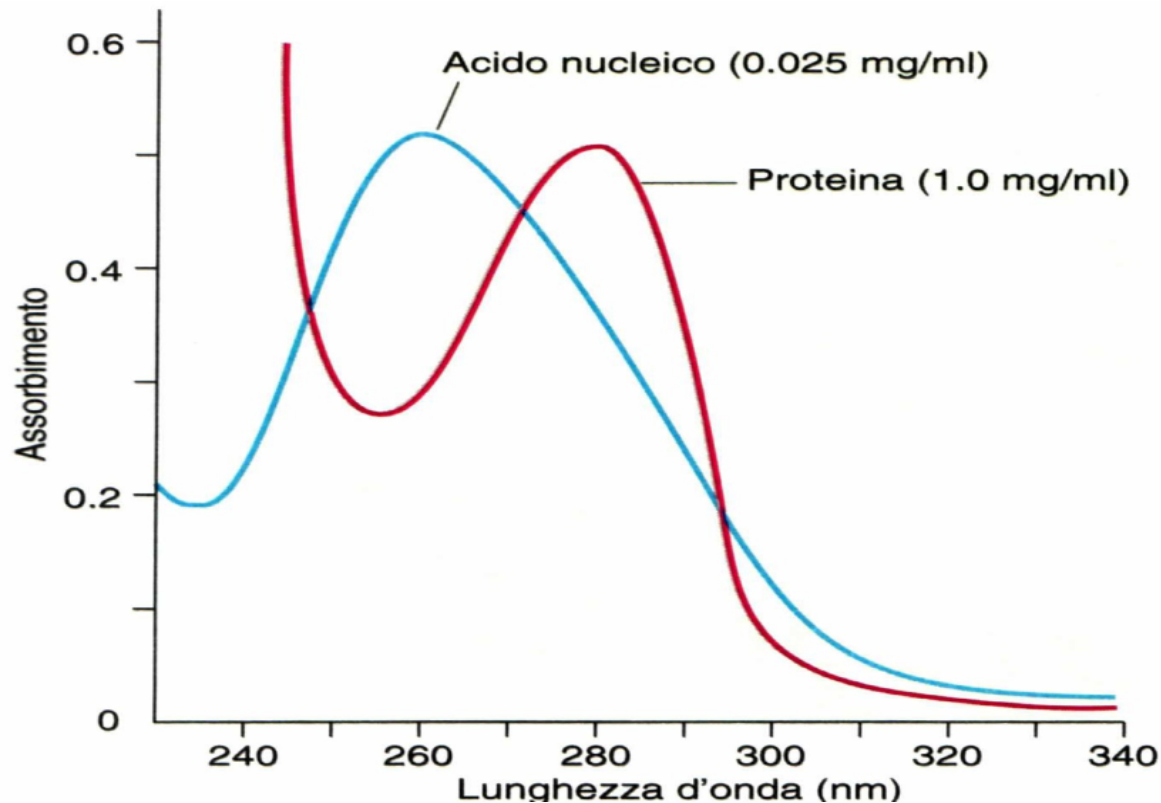
d = lunghezza del cammino ottico espressa in cm.

ϵ = Coefficiente di Estinzione Molare caratteristico della sostanza che assorbe luce $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$

STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE LO SPETTROFOTOMETRO



STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE LO SPETTOFOTOMETRO



RATIO: rapporto di assorbanza 260/280.

La ratio deve avere dei valori caratteristici ($>1,7$ per DNA; 2 per RNA) e ci indica il grado di purezza dell'acido nucleico che stiamo andando a isolare.

Fluorescenza

Proprietà di alcuni atomi e molecole di assorbire la luce ad una particolare λ ed emettere luce ad una λ maggiore

Fluorescenza
primaria
(autofluorescenza)



- vit. A
- porfirine
- clorofilla

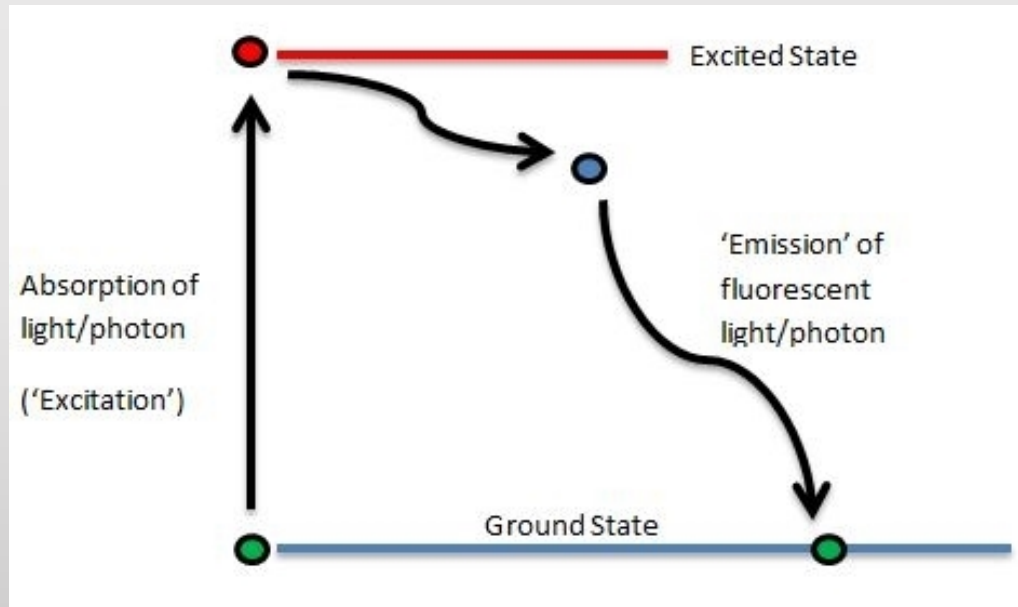
Fluorescenza
secondaria



Aggiunta di fluorocromi

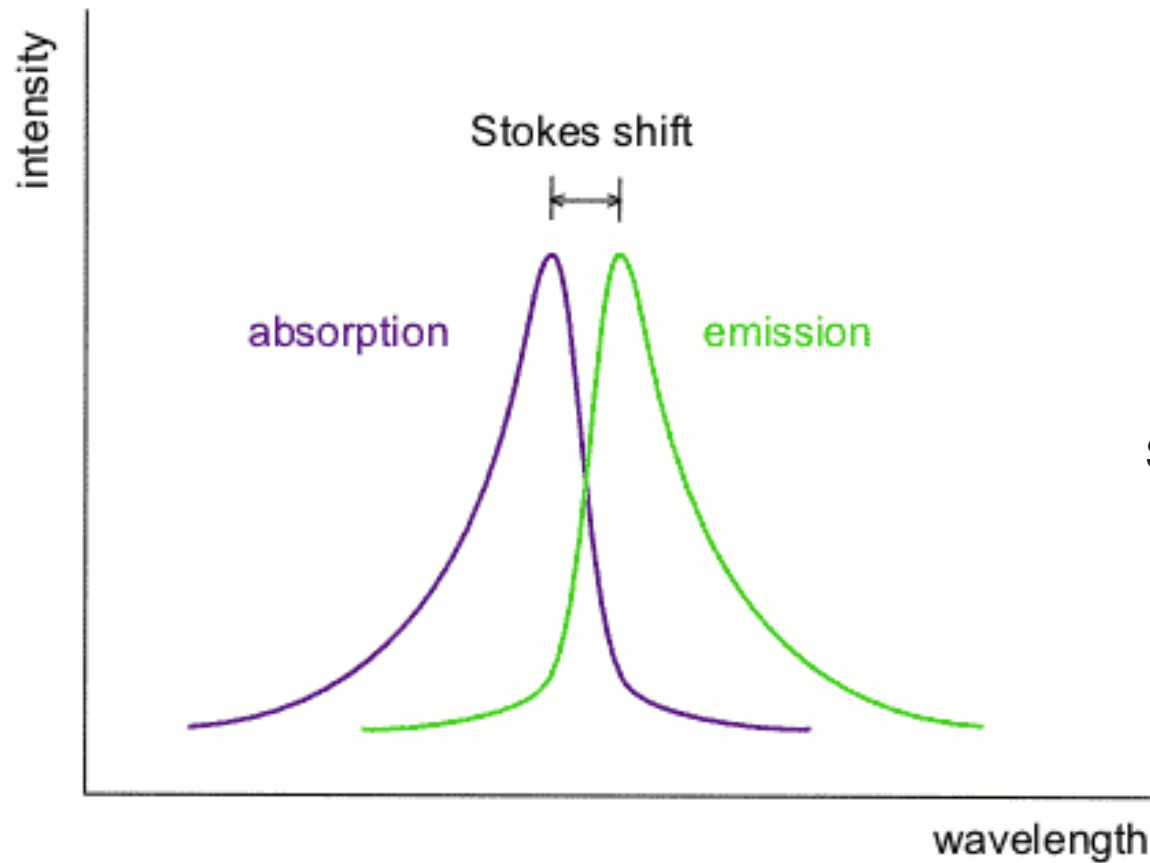
Fluorofori (o Fluorocromo)

Alcune molecole dopo avere assorbito fotoni di una certa λ , si eccitano ed emettono fluorescenza ad una λ maggiore, visibile.



Esistono diversi tipi di fluorofori, caratterizzati da diversi spettri di assorbimento e di emissione.

Stokes shift



(1819-1903)

Sir George Gabriel Stokes

STIMA DELLA CONCENTRAZIONE MEDIANTE IL FLUORIMETRO

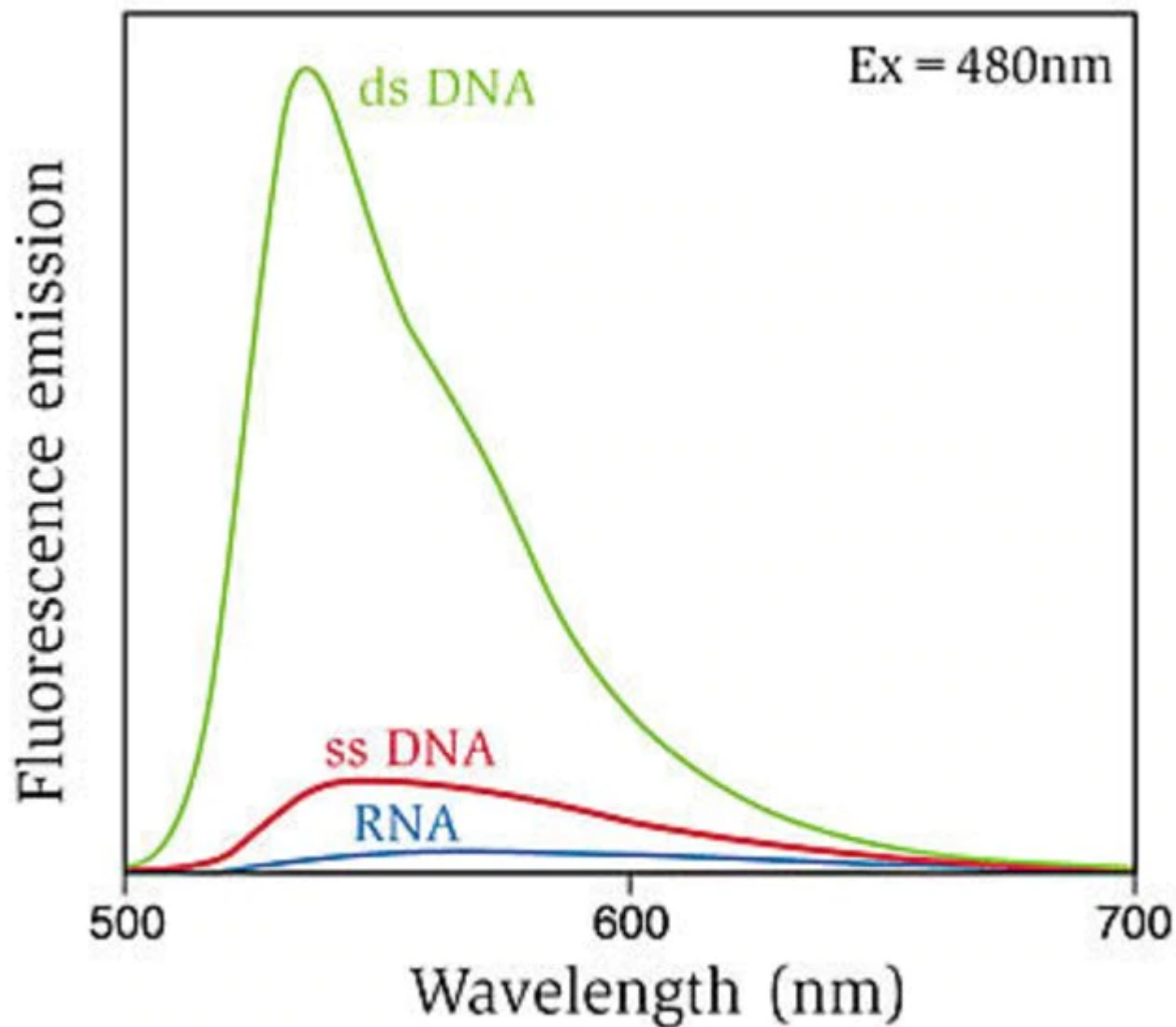
La quantificazione fluorometrica della concentrazione di DNA si basa sull'uso di coloranti che si legano selettivamente al DNA.

Al momento del legame, il colorante subisce una modifica conformazionale che porta all'emissione di energia fluorescente, che può essere rilevata dalle apparecchiature appropriate.

Esempi di tali coloranti comprendono per es. i coloranti SYBR[®] Green, e PicoGreen[®].

La quantità di fluorescenza emessa da tali coloranti è direttamente proporzionale alla concentrazione di DNA presente in un campione incognito, stimando la sua concentrazione confrontando l'intensità della fluorescenza emessa dal campione 'X' con una curva di calibrazione stabilita dallo strumento.

dsDNA specificity



Fluorescence enhancement of the PicoGreen® Quantitation Reagent upon binding dsDNA, ssDNA and RNA.

RESEARCH

Open Access

Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods

Tatiana Sedlackova^{1*}, Gabriela Repiska¹, Peter Celec^{1,3}, Tomas Szemes^{2,3} and Gabriel Minarik^{1,3}

Abstract

Background: Specific applications and modern technologies, like non-invasive prenatal testing, non-invasive cancer diagnostic and next generation sequencing, are currently in the focus of researchers worldwide. These have common characteristics in use of highly fragmented DNA molecules for analysis. Hence, for the performance of molecular methods, DNA concentration is a crucial parameter; we compared the influence of different levels of DNA fragmentation on the accuracy of DNA concentration measurements.

Results: In our comparison, the performance of the currently most commonly used methods for DNA concentration measurement (spectrophotometric, fluorometric and qPCR based) were tested on artificially fragmented DNA samples. In our comparison, unfragmented and three specifically fragmented DNA samples were used.

According to our results, the level of fragmentation did not influence the accuracy of spectrophotometric measurements of DNA concentration, while other methods, fluorometric as well as qPCR-based, were significantly influenced and a decrease in measured concentration was observed with more intensive DNA fragmentation.

Conclusions: Our study has confirmed that the level of fragmentation of DNA has significant impact on accuracy of DNA concentration measurement with two of three mostly used methods (PicoGreen and qPCR). Only spectrophotometric measurement was not influenced by the level of fragmentation, but sensitivity of this method was lowest among the three tested. Therefore if it is possible the DNA quantification should be performed with use of equally fragmented control DNA.

Keywords: DNA fragmentation, DNA quantitation, Spectrophotometry, PicoGreen, qPCR

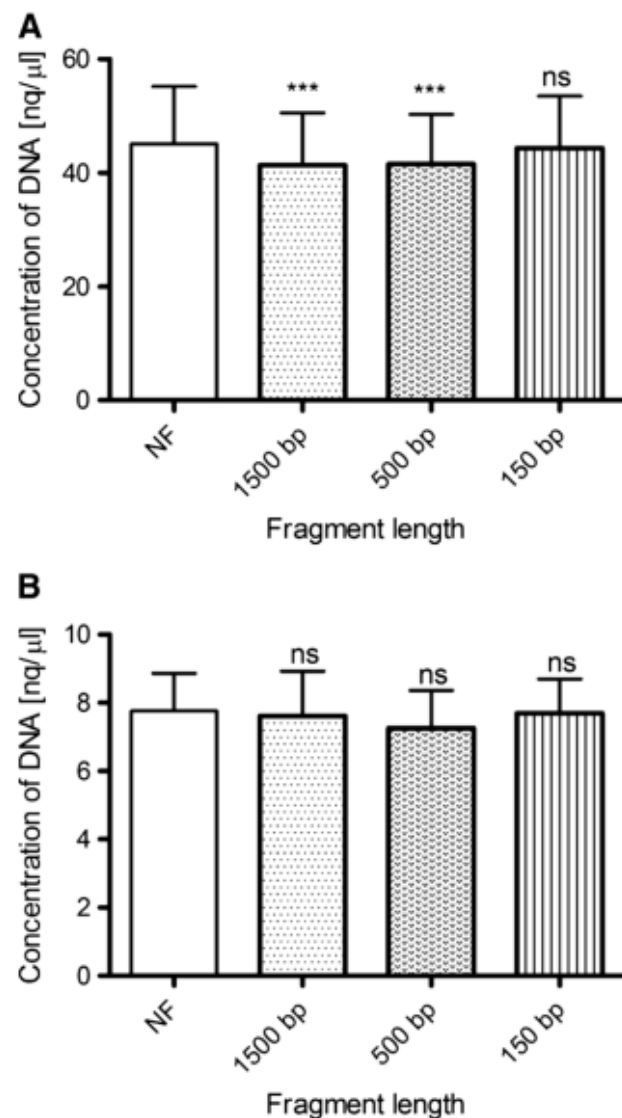


Figure 1 UV spectrophotometric quantification of DNA by NanoDrop. (A) Quantification of undiluted samples showed that the DNA quantity in the samples with the length of fragments approx. 1500 bp and 500 bp significantly decreased compared to concentration of unfragmented samples. There was no difference between the concentration of unfragmented DNA samples and specimens with the fragment length of 150 bp. (B) The DNA concentration of 10-fold diluted samples was not affected by the level of fragmentation. ns, statistically non-significant; ***, $p < 0.0001$.

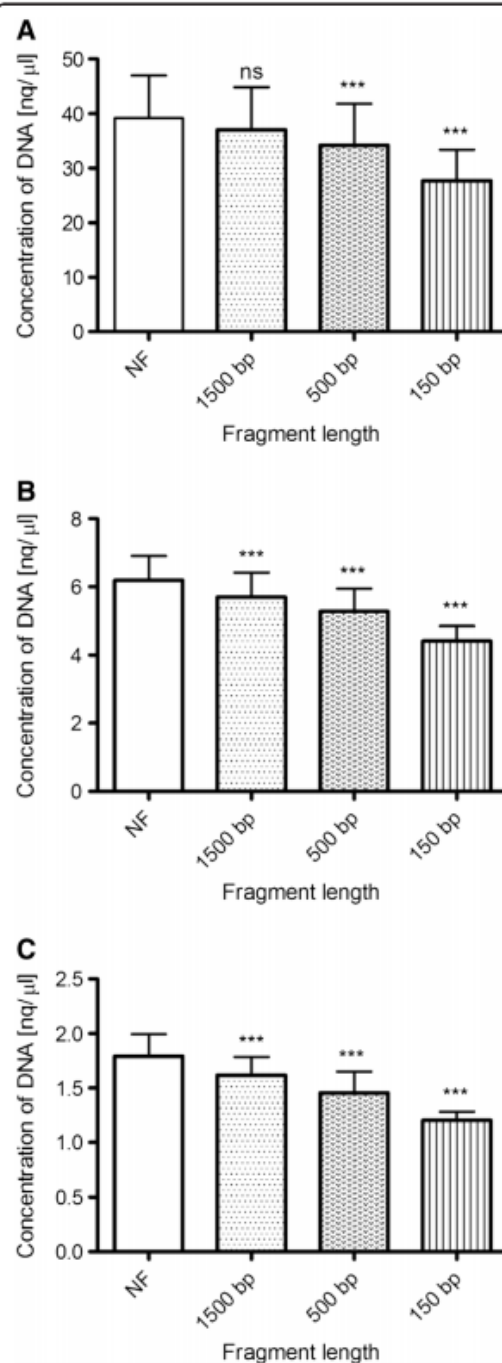


Figure 2 Measurement of DNA concentration by PicoGreen. (A) The DNA quantity of 10-fold diluted samples decrease as degree of fragmentation increase. (B) The concentration of DNA of 100-fold diluted samples is affected by level of the fragmentation in all different fragment lengths. (C) The DNA concentration of 1000-fold samples is also affected by degree of the fragmentation in all cases of fragment lengths. ns, statistically non-significant; ***, $p < 0.0001$.

fragmentation in a fashion similar to PG. Smaller fragments resulted in lower concentrations measured. There was one exception to this observation, when the unfragmented specimens had lower concentrations measured in comparison to specimens which were fragmented to approx. 1500 bp. This exception was observed in all three dilutions and may have been the result of the complexity of unfragmented samples, when the effectiveness of amplification might be impaired by a worse accessibility of target sequences, e.g. because of secondary structures in complex DNA molecules. When unfragmented specimens were excluded from the statistical analysis of concentration measurements the statistically significant differences were confirmed between 1500 bp, 500 bp and 150 bp fragments ($p < 0.0001$, $F = 60.42$, $F = 40.18$ and $F = 15.98$ for 10x, 100x and 1000x diluted samples, respectively). The differences regarding the decrease in measured concentration with respect to the fragmentation level could be the result of damage to the target sequences available for primer pair annealing and subsequent successful qPCR amplification. Therefore, measurement accuracy could also depend on the qPCR assay design, when shorter amplicons should be less affected. Nevertheless, the qPCR method showed more advantages than just an extremely high sensitivity. Other advantages include the identification of trace amounts of DNA (detection of less than 1 genomic equivalent is important in non-invasive prenatal diagnostics [21]), the detection of (q)PCR inhibitors in the analysed sample (important for forensic DNA analyses [22]) and the estimation of DNA fragmentation level when a combined Alu-based assay is implemented for DNA integrity detection [23] (which enables correction of fragmented DNA concentration measurement inaccuracy).

Conclusions

Our work showed that the accuracy of concentration measurements based on fluorescent dyes and qPCR is influenced by the degree of DNA fragmentation, while this effect was not observed in DNA quantification by spectrophotometry. Therefore, we recommend quantifying intact

Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system

M O'Neill¹, J McPartlin², K Arthure¹, S Riedel¹ and ND McMillan¹

¹Drop Technology Ltd., Tallaght Business Park, Whitestown, Dublin 24, Ireland.

Table 1. The use of fluorescence dye-based and A260 absorbance measurement for quality control in the NGS pipeline.

	Qubit/PicoGreen	NanoDrop
Primary application	Quantity	Quality
Numbers of wavelengths used	2	1
Signal-to-background noise	High	Low
Sensitivity	High (~1000x greater than Nano Drop)	Low
Specificity for double-stranded DNA	• High • The dye intercalates only into double-stranded DNA	• Low • Single-stranded nucleic acids and nucleotides can contribute to the signal • Inability to distinguish between DNA and RNA

MISURA DELLA QUANTITA' CON LA qPCR

E' una tecnica di PCR in tempo reale

Gli strumenti di rilevazione misurano l'accumulo di prodotto DNA dopo ogni ciclo di amplificazione della PCR utilizzando reporter fluorescenti.

I reporter possono essere coloranti con SYBR[®] green o essere sonde come TaqMan[®].

Si notano: una curva di amplificazione, che mostra il segnale fluorescente in unità fluorescenti relative (RFU) versus numero di ciclo che traccia l'accumulo del prodotto amplificato.

La baseline viene misurata all'inizio del processo di amplificazione prima che lo strumento sia in grado di rilevare la formazione del prodotto. Quando il DNA si accumula, raggiunge un punto in cui lo strumento è in grado di rilevare la variazione di fluorescenza al di sopra del livello di fondo

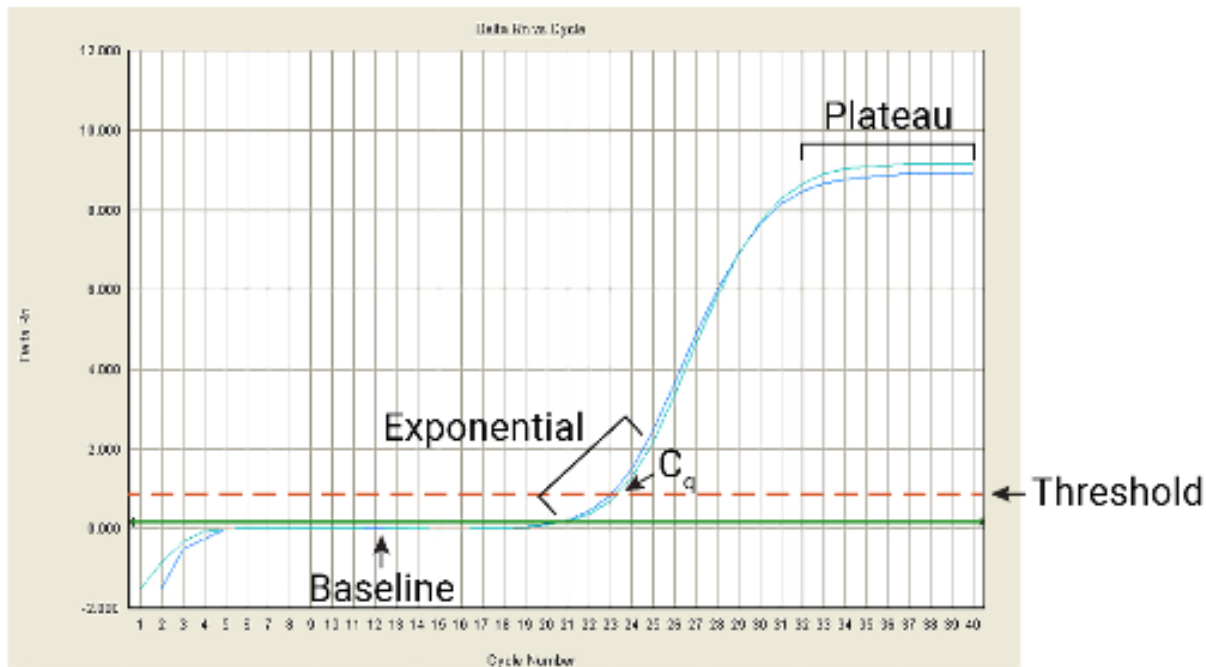


Figure 6. Example of a real-time PCR amplification plot showing the relationship between baseline, detection threshold and quantification cycle (C_q).

DNA estratto:

1) Purezza da contaminanti proteici ed estrazione

2) QUALITA'

Valutazione qualitativa DNA estratto

Per poter visualizzare il DNA su un gel, altrimenti invisibile, bisogna colorarlo con un agente intercalante che emette fluorescenza quando eccitato a lunghezze d'onda ultraviolette (GelRed)

- I gel più utilizzati sono quelli di agarosio con concentrazioni 0,7 - 2% p/v
- A basse concentrazioni si risolvono meglio i pesi molecolari alti (es. DNA genomico)
- Ad alte concentrazioni si risolvono meglio i pesi molecolari bassi (amplificati di PCR)

How helpful is quantitation?

- Optimum amount of template: 0.5 to 2.0 ng
- 6 to 7 pg of DNA in each diploid human cell
- In a mixed sample containing 0.5 ng of template, less than 0.5 ng comes from each contributor

Valutazione qualitativa DNA estratto

L' elettroforesi è senza dubbio una delle tecniche maggiormente utilizzate nei laboratori di biologia molecolare, che permette la separazione la visualizzazione e la purificazione di molecole di interesse biologico quali **acidi nucleici e proteine**.

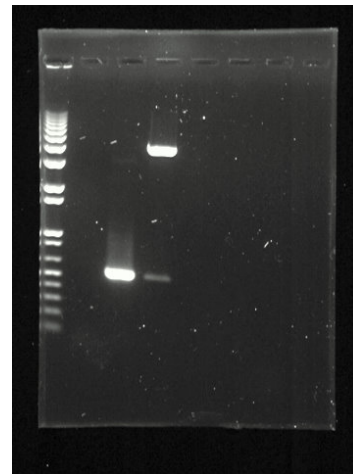
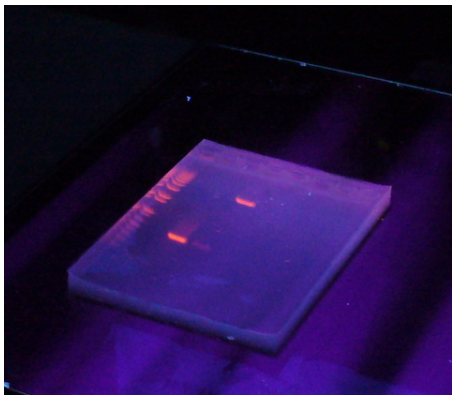
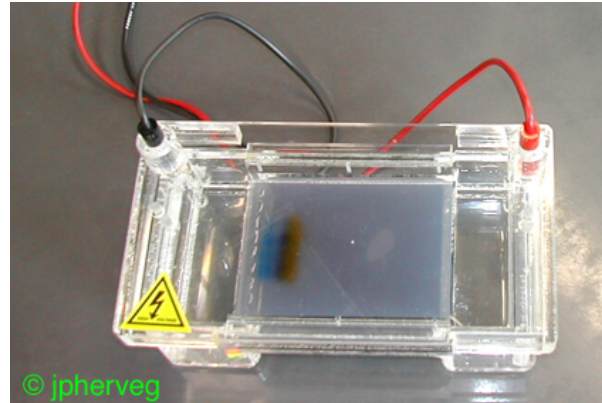
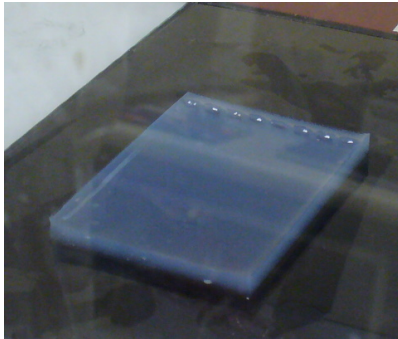
Tale separazione è resa possibile e dal **peso molecolare** e dalla **carica elettrica** di cui sono dotate le particelle, ioni o macromolecole.

Tali particelle poste in un campo elettrico generatosi dalla d.d.p. applicata a due elettrodi, si muoveranno in direzione dell'elettrodo di carica opposta, quelle cariche positivamente verso il polo negativo e viceversa.

Gli acidi nucleici migrano sempre verso il polo positivo per la presenza nella loro molecola di cariche negative dei gruppi fosfato (PO_4^{--}).

Valutazione qualitativa DNA estratto

GEL DI AGAROSIO



Conservazione del DNA

Il DNA estratto e purificato è in genere risospeso in H₂O distillata sterile ultrapura o in soluzioni a bassa concentrazione salina (pH 7.4).

+4°C: stabile per alcune settimane

-20°C: stabile più a lungo

(evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento che possono danneggiare il DNA)

-80°C: stabile per molti anni

- **RNA sempre a -80°C**

Alcuni esempi

ESTRAZIONE di ACIDI NUCLEICI CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A DNA ESTRATTO DA TESSUTI FISSATI IN FORMALINA E INCLUSI IN PARAFFINA (FFPE)

Fasi

1. Taglio 8-10 fette da biopsie, 2-3 da pezzo operatorio dello spessore di 10 μm
2. Sparaffinatura/digestione O.N. con tampone di lisi più proteinasi K
3. Purificazione dell'acido nucleico (più metodi)
4. Precipitazione DNA
5. Valutazione quantitativa
6. Conservazione

Processo di sparaffinatura

1. Aggiungere 1 ml di EtOH
2. Mescolare per 5 min
3. Centrifugare a 12000 rpm per 2 min
4. Eliminare l'EtOH facendo attenzione a non toccare il pellet
5. Fare asciugare i campioni e aggiungere il tampone di lisi (TRIS-HCl 50 mM ph 8.3) e la proteinasi K (20 mg/ml)

Fasi

1. Taglio 8-10 fette da biopsie, 2-3 da pezzo operatorio dello spessore di 10 μm
2. Sparaffinatura/digestione O.N. con tampone di lisi più proteinasi K
3. Purificazione dell'acido nucleico (più metodi)
4. Precipitazione DNA
5. Valutazione quantitativa
6. Conservazione

Purificazione acidi nucleici

1. Metodo fenolo/cloroformio (miscela fenolo: cloroformio: alcool isoamilico (25:24:1))
2. Metodo del salting out (precipitazione delle molecole proteiche)
3. Kits commerciali (molto in uso), maggiore velocità di estrazione

Altri esempi

ESTRAZIONE di ancientDNA DA OSSA, DENTI ANTICHI
con diversi metodi

Ancient DNA extraction from bones and teeth

Nadin Rohland & Michael Hofreiter

Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Deutscher Platz 6, D-04103 Leipzig, Germany. Correspondence should be addressed to N.R. (rohland@eva.mpg.de).

Published online 12 July 2007; doi:10.1038/nprot.2007.247

This method is designed to maximize recovery of PCR-amplifiable DNA from ancient bone and teeth specimens and at the same time to minimize co-extraction of substances that inhibit PCR. This is achieved by a combination of DNA extraction from bone powder using a buffer consisting solely of EDTA and proteinase K, and purification of the DNA by binding to silica in the presence of high concentrations of guanidinium thiocyanate. All steps are performed at room temperature (20–23 °C), thereby reducing further degradation of the already damaged and fragile ancient DNA and providing an optimal trade-off between DNA release and degradation. Furthermore, the purification step removes most of the various types of PCR inhibitors present in ancient bone samples, thereby optimizing the amount of ancient DNA available for subsequent enzymatic manipulation, such as PCR amplification. The protocol presented here allows DNA extraction from ancient bone and teeth with a minimum of working steps and equipment and yields DNA extracts within 2 working days.



Comparison and optimization of ancient DNA extraction

Nadin Rohland and Michael Hofreiter

BioTechniques 42:343-352 (March 2007)
doi 10.2144/000112383

Ancient DNA analyses rely on the extraction of the tiny amounts of DNA remaining in samples that are hundreds to tens of thousands of years old. Despite the critical role extraction efficiency plays in this field of research, no study has comprehensively compared ancient DNA extraction techniques to date. There are a wide range of methods currently in use, which rely on such disparate principles as spin columns, alcohol precipitation, or binding to silica. We have compared a number of these methods using quantitative PCR and then optimized each step of the most promising method. We found that most chemicals routinely added to ancient DNA extraction buffers do not increase, and sometimes even decrease, DNA yields. Consequently, our optimized method uses a buffer consisting solely of EDTA and proteinase K for bone digestion and binding DNA to silica via guanidinium thiocyanate for DNA purification. In a comparison with published methods, this minimalist approach, on average, outperforms all other methods in terms of DNA yields as measured using quantitative PCR. We also found that the addition of bovine serum albumin (BSA) to the PCR helps to overcome inhibitors in ancient DNA extracts. Finally, we observed a marked difference in the performance between different types of DNA polymerases, as measured by amplification success.

Table 6. Success of Conventional PCR Amplification Using Two Different Dilutions (1:10 and 1:50) of Eight Ancient Cave Bear Samples, Extracted with Each Method in Duplicate

Extraction Method	A Silica		B Modified Silica-NaCl		C Modified Silica-GuSCN		D Phenol/ Chloroform		E Ethanol Precipitation		F Qiagen Kit	
Sample ID	1:10	1:50	1:10	1:50	1:10	1:50	1:10	1:50	1:10	1:50	1:10	1:50
233.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
233.2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
243.1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
243.2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
322.1	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
322.2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
576.1	+	+	+	+	+	(+)	+	+	-	-	+	+
576.2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+
748.1	+	-	+	(+)	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
748.2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
751.1	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
751.2	+	+	+	-	-	+	+	-	(+)	-	+	-
891.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+
891.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+
1050.1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(+)	+
1050.2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	(+)	(+)
Σ	28/32		26/32		25/32		20/32*		9/32*		13/32*	

+, indicates a distinct band on the agarose gel; (+), indicates a faint band on the agarose gel; and -, indicates no band on the agarose gel. Significantly worse performing methods are indicated by an asterisk (*), $P < 0.05$, Fisher's exact test.

http://www.biology.arizona.edu/human_bio/problem_sets/DNA_forensics_2/DNA_forensics.html