

Progetto formativo aziendale

PCR TRADIZIONALE E REAL-TIME PER IL RILEVAMENTO DEL DNA DI *LEISHMANIA* spp.

Roma 13-15-27 Ottobre 2015

METODI DI ESTRAZIONE DEL DNA

Roma, 13 ottobre 2015

Dr.ssa Laura Salvato

DO SIEROLOGIA IZSLT SEDE DI ROMA

LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Metodi di estrazione del DNA

Meccanico : mortaio
 omogenizzatore
 congelamento/scongelo
 biglie di vetro

Enzimatico: proteinasasi k
 lisozima

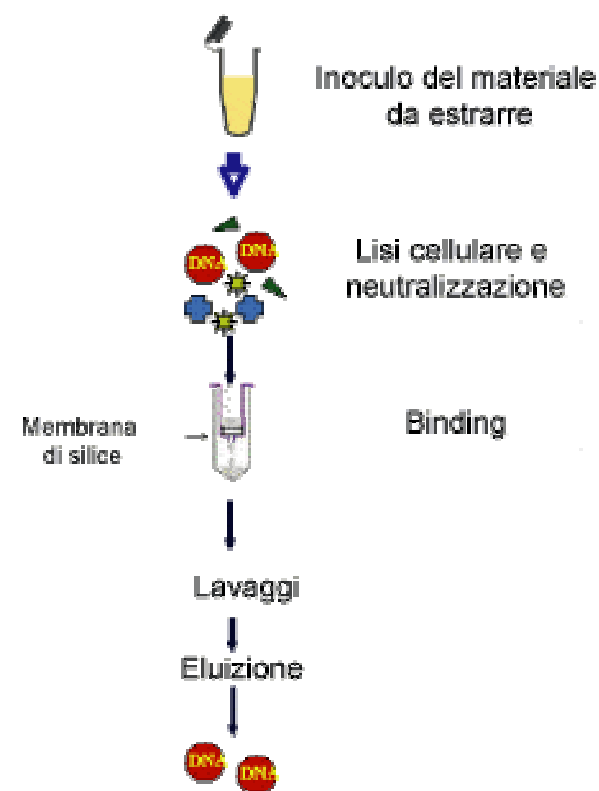
Chimico: sds-sali caotropici



Estrazione enzimatica del DNA

Tecnica:

- aggiunta di PK (enzima) e Buffer (ALT)
- incubazione in termomixer a 56°C per 10'
- rottura della membrana esterna delle cellule
- incubazione in termomixer a 70°C per 10'
- aggiunta di etanolo
- colonna
- lavaggi
- eluizione (buffer)



Estrazione del DNA da buffy coat

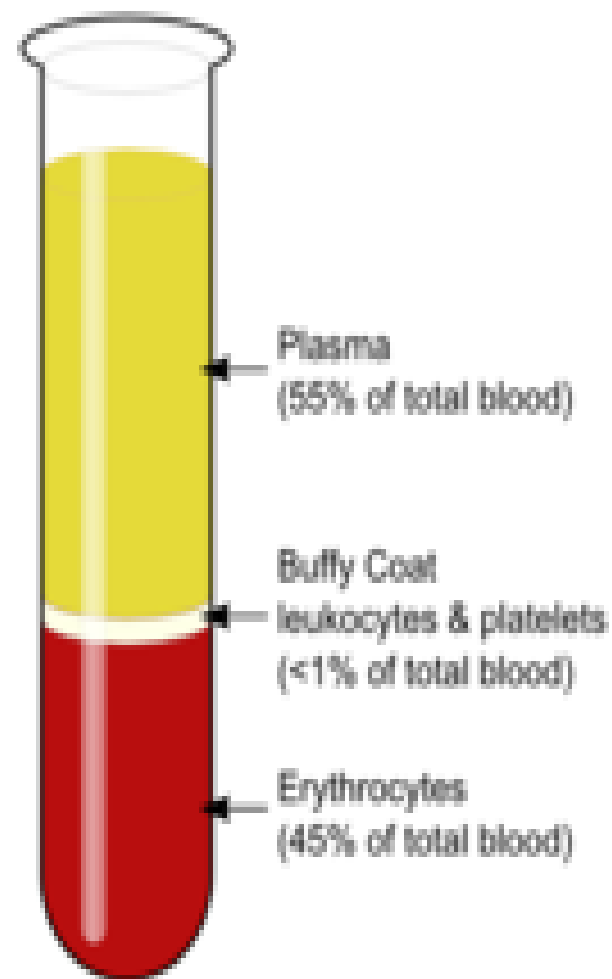
Centrifugazione

2500 g x 5'

Prelevare i leucociti

(200 µl)

Aggiungere la PK



Estrazione del DNA da tessuti

Tecnica

- Sezionamento (25mg di tessuto)
- Biglie di vetro (lisyng Matrix D)
- Fast prep
- Rottura della membrana esterna delle cellule
- Incubazione con buffer e PK
- Colonna
- Lavaggi
- Eluizione (buffer)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



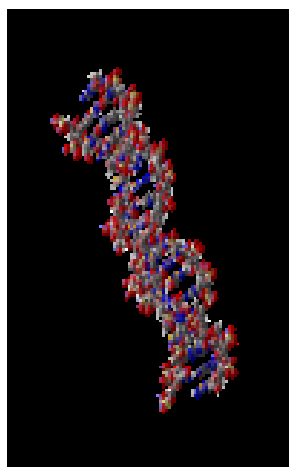
Controllo del DNA estratto

1. lettura fotometrica (valutazione quantitativa)
2. amplificazione della β -actina (controllo interno)
3. elettroforesi su gel di agarosio (valutazione qualitativa)



1. Lettura fotometrica

estrazione del DNA



lettura al fotometro



valori di assorbanza attesi

A260 nm (Dna) = 0,1-1,0

A340 nm (torbidita) = 0,0

A280 nm (proteine) < 1,0

A230nm (carboidrati) < 1,0

lunghezza d'onda (λ)

260 nm → DNA

280 nm → proteine e fenoli

230 nm → residui di zuccheri, sali, solventi organici

340 nm → torbidità della soluzione.

rapporto A260 nm/A280 nm:

stima la purezza della soluzione di acidi nucleici

valore ottimale = 1,8

(range = 1,5 – 2,0)



Controllo di qualità in PCR

- **Controllo negativo:** evidenzia i falsi positivi dovuti a contaminazione (master mix completa senza DNA stampo)
- **Controllo positivo:** evidenzia i falsi negativi verificando la funzionalità di tutti i reagenti e dell'apparecchiatura utilizzata per amplificare (master mix + campione in cui è contenuta la sequenza bersaglio)
- **Controllo interno di reazione:** evidenzia i risultati falsi negativi che possono essere dovuti a estrazione del DNA inadeguata o alla presenza di fattori di inibizione della PCR (amplificazione di una sequenza sicuramente presente nel campione di DNA estratto)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

2. controllo interno di reazione: amplificazione della β -actina

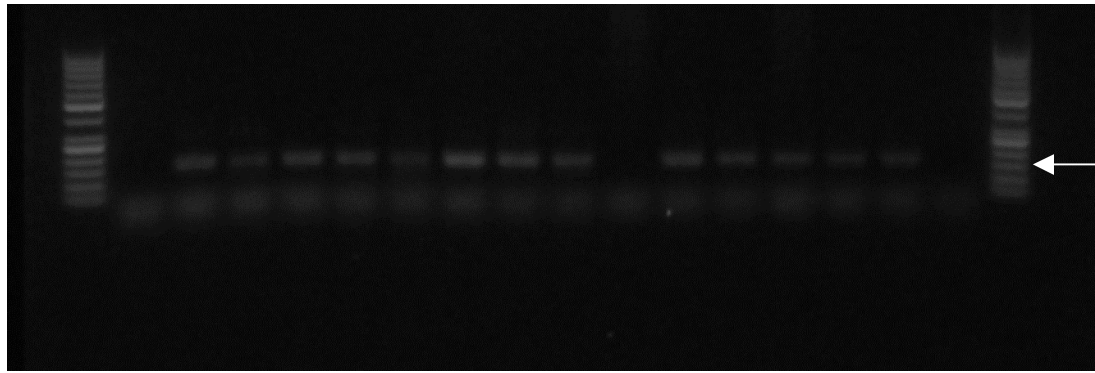
- L'actina è una proteina di forma globulare che costituisce i microfilamenti delle cellule e i filamenti sottili delle cellule muscolari e che rappresenta il 5-10% di tutte le proteine delle cellule eucariotiche.
- Nei vertebrati esistono 3 isoforme di actina (α , β , γ) codificate da geni diversi.
- La β -actina è l'isoforma presente nei microfilamenti del citoplasma ed è sempre presente nelle matrici biologiche prelevate da mammiferi.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

amplificazione della β -actina



prodotto di amplificazione 146-250 bp
(dipende dalla specie)

- β -actin-Rev (TTGCTGATCCACATCTGCTG)
- β -actin-For (GACAGGATGCGAAAGGAGAT)
- PCR end-point
- sequenza genica conservata in tutte le cellule di mammifero

[CANCER RESEARCH 59, 3119-3127, July 1, 1999]

GD3 Ganglioside Antibody Augments Tumoricidal Capacity of Canine Blood Mononuclear Cells by Induction of Interleukin 12¹

Stuart C. Helfand,² Erin B. Dickerson, Keith L. Munson, and Marcia L. Padilla

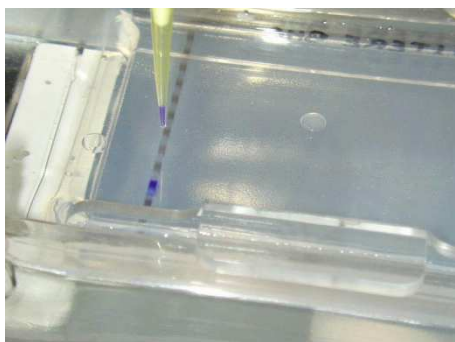
School of Veterinary Medicine, Department of Medical Sciences [S.C.H., E.B.D., K.L.M., M.L.P.] and University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center [S.C.H.], University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati come primers sono state controllate su BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

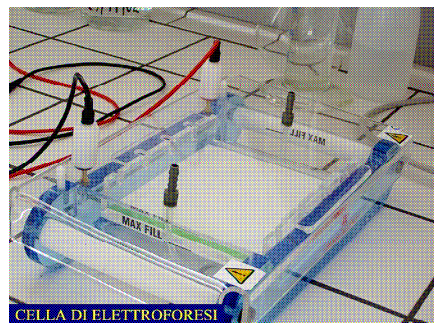


3. Elettroforesi del DNA estratto su gel di agarosio

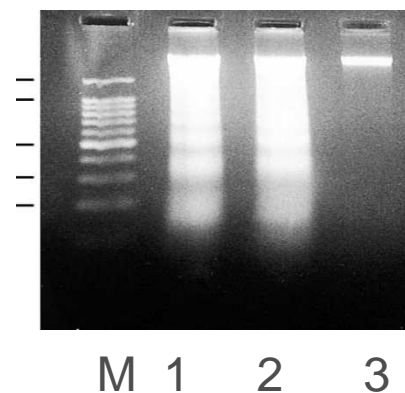
Caricamento del DNA su
gel di agarosio all'1%



Elettroforesi del DNA



Analisi del DNA

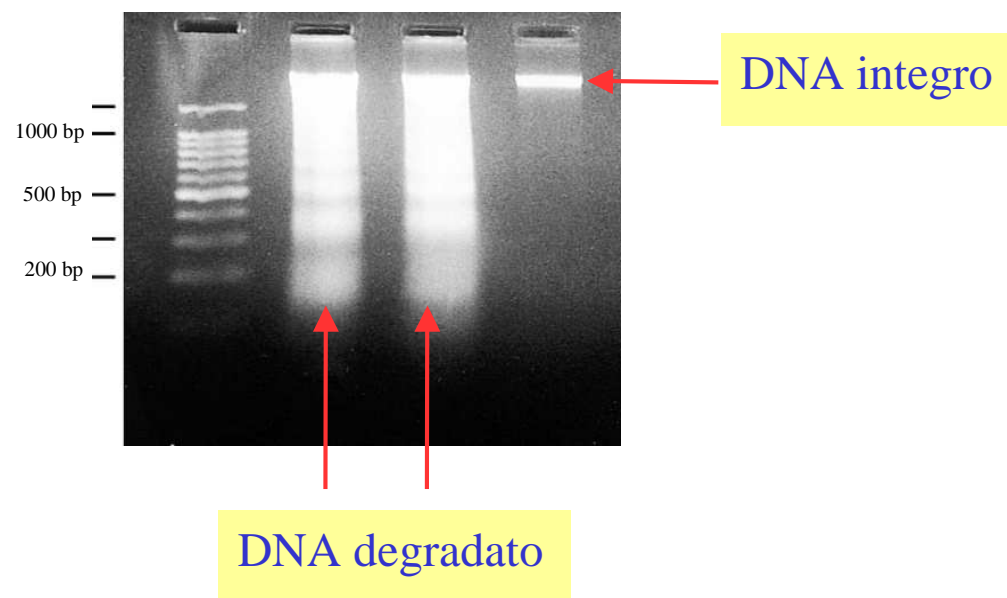


La qualità del DNA è verificata visualizzando al transilluminatore (raggi UV) la corsa elettroforetica di 10 μ l dell'acido nucleico estratto caricato su gel di agarosio al 1% in TAE 1X, colorato con GelRed Nucleic Acid Stain.



Elettroforesi del DNA estratto su gel di agarosio

Analisi del DNA



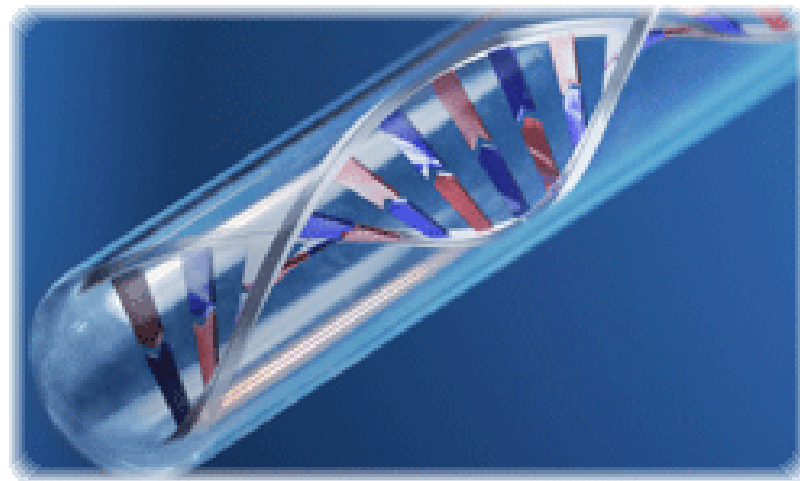


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

METODI DI ESTRAZIONE DEL DNA

Roma, 13 ottobre 2015

Grazie per l'attenzione



LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT

