

Progetto formativo aziendale

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

Roma 13-15-27 Ottobre 2015

Messa a punto di un protocollo di PCR tradizionale

Roma, 13 ottobre 2015

Dr.ssa Laura Salvato

DO SIEROLOGIA IZSLT - SEDE DI ROMA

LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT

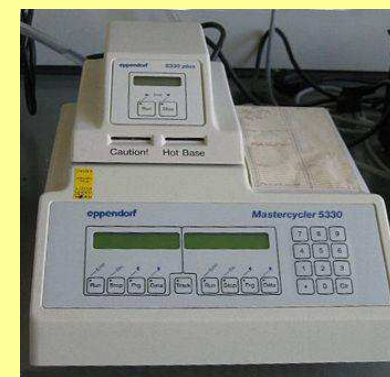


Amplificazione del DNA

L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

Preparazione della Master Mix:

- Dna (stampo)
- Oligonucleotidi (dNTP)
- Primers (innesco)
- Taq DNA polimerasi (enzima termo-resistente)
- Buffer (per mantenere stabile il pH)
- Magnesio (per il corretto funzionamento della Taq polimerasi)
- Acqua per portare a volume la reazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Fasi di messa a punto di un protocollo di PCR

- ricerca bibliografica
- procedura di estrazione
- ottimizzazione della fase di amplificazione:
scelta dei primers, concentrazione di $MgCl_2$, scelta della temperatura di annealing e del profilo termico
- scelta dei controlli positivi





Scelta dei primers

- ✓ obiettivo della PCR: amplificare una specifica sequenza bersaglio senza contemporaneamente amplificare altre sequenze con formazione di prodotti aspecifici
- ✓ le estremità della sequenza da amplificare devono essere identificate con precisione per poter sintetizzare degli oligonucleotidi (Genbank)
- ✓ lunghezza di almeno 16 nucleotidi (preferibilmente 20-24)
- ✓ devono contenere il 40-60% di G+C e va fatta attenzione a non superare questa quantità per evitare la formazione di strutture secondarie interne



Scelta dei primers

- ✓ le estremità 3' dei primers non devono essere complementari per impedire che si formino dimeri di primer durante la reazione di PCR
- ✓ sono usati ad una concentrazione che varia da 0,1 a 1,0 μM (sufficiente per almeno 30 cicli di amplificazione) che va ottimizzata utilizzando più diluizioni scalari.
- ✓ concentrazioni più elevate possono portare a una riduzione dell'efficienza di amplificazione in seguito a due meccanismi:
 - appaiamento dei primers tra di loro (dimeri) anziché con lo stampo
 - "priming" a siti ectopici con amplificazione di sequenze indesiderate (prodotti aspecifici)
- ✓ Concentrazioni più basse la PCR rischiano di rendere l'amplificazione inefficiente



Verifica della scelta primers

La sequenza dei primers viene controllata attraverso l'interfaccia web di programmi specifici come BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) al fine di:

- ✓ verificare la sequenza del prodotto di amplificazione previsto
- ✓ verificare la validità biologica : cercare eventuali somiglianze con regioni diverse da quella attesa per evitare di avere risultati falsi positivi
- ✓ controllare eventuali *mismatch* che portano alla produzione di prodotti aspecifici





scelta della temperatura di annealing

La temperatura di annealing (**T_a**) dei primers dipende:

- ✓ dal loro contenuto in G+C
- ✓ dalla loro lunghezza
- ✓ dalla temperatura di fusione o melting (**T_m**) tra primer e la sua elica complementare sul DNA stampo

$$T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] \text{ } ^\circ\text{C}$$

Dove G, C, A e T indicano il numero di nucleotidi contenenti le basi azotate guanina, citosina, adenina o timina. Nel caso i due primer abbiano T_m diverse generalmente si sceglie la T_m più bassa.

Solitamente si utilizza come temperatura di annealing la T_m -5 °C anche se spesso l'utilizzo della T_m non ridotta può portare ad avere ottime rese nella reazione di PCR





Scelta della concentrazione del Cloruro di magnesio (MgCl₂)

MgCl₂ ha due ruoli:

1. è un **cofattore** essenziale per la Taq DNA polimerasi per l'incorporamento dei nucleotidi
1. influenza l'appaiamento dei primer allo stampo

**maggiore è la concentrazione di MgCl₂
minore è la specificità dell'appaiamento**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

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

Controllo POSITIVO

campione contenente la sequenza bersaglio da amplificare

Coltivazione di *Leishmania infantum*: nel nostro laboratorio viene coltivato il ceppo di Leishmania MHOM/IT/80/IPT1 utilizzando il terreno di coltura Evans' modified Tobie's medium (EMTM) e viene successivamente estratto il DNA dalla coltura utilizzando un metodo di estrazione enzimatico.

clonaggio molecolare: inserimento di un frammento di DNA in un plasmide (vettore); introduzione del nuovo plasmide creato in una cellula ospite, in genere *E. coli*; selezione e moltiplicazione della cellula ospite per ottenere una grande quantità di plasmidi d'interesse; estrazione del DNA dalle colonie selezionate.

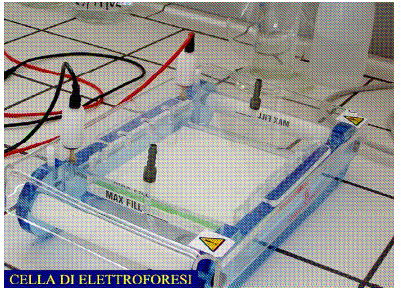




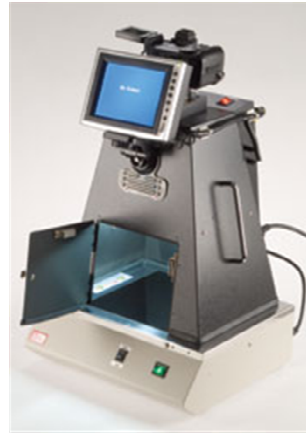
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Analisi dei risultati



Elettroforesi del DNA



Lettura



Analisi dei risultati

I prodotti della reazione (10 μ l) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% in TAE buffer con l'aggiunta di GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, 10.000x in H₂O) e visualizzati mediante raggi UV, ponendo come controllo dell'altezza dell'amplificato un peso molecolare di 50 bp (GeneRuler 50bp DNA Ladder, Thermo Scientific).



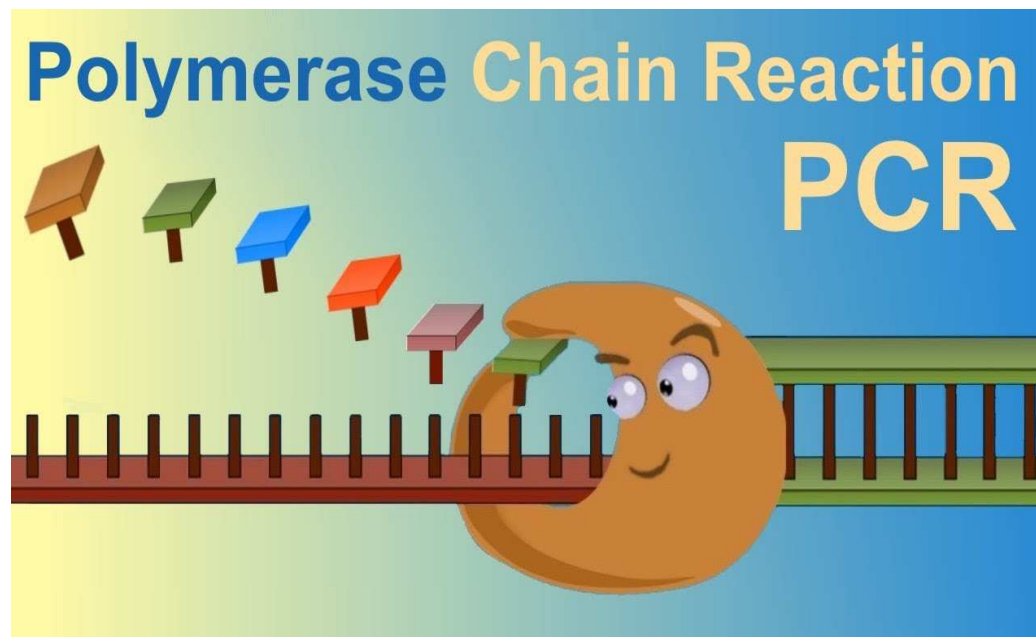


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Messa a punto di un protocollo di PCR tradizionale

Roma, 13 ottobre 2015

Grazie per l'attenzione



LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT

