



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Progetto formativo aziendale

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

Roma 13-15-27 Ottobre 2015

Estrazione del DNA dalle diverse matrici biologiche

Roma 15/10/2015

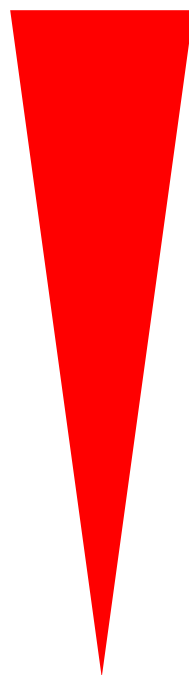
Dr.ssa Laura Salvato

DO SIEROLOGIA IZSLT SEDE DI ROMA





Matrici biologiche utilizzate per la ricerca del DNA di *Leishmania* in ordine decrescente di sensibilit 



Midollo osseo

Ago aspirato linfonodo

Milza

Raschiato/biopsia cute

Tampone congiuntivale

Buffy coat

Sangue intero





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Le fasi di estrazione dell'acido nucleico (DNA) prevedono:

Lisi della cellula

Separazione

Precipitazione

Recupero dell'acido nucleico

Eluizione e quantizzazione

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione utilizzata, l'acido nucleico estratto deve essere “puro”, privo di sostanze inibenti.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Lisi cellulare

I metodi tradizionali di lisi si basano su trattamenti complessi che includono:

- digestione enzimatica e/o tecniche meccaniche di spaccatura
- solubilizzazione tramite detergente



Qualsiasi sia il metodo utilizzato e' necessario non alterare l'acido nucleico





Separazione dell'acido nucleico

La separazione del DNA dai contaminanti può essere effettuata attraverso l'uso di:

- Solventi organici (fenolo-cloroformio)



- adsorbimento del DNA sulla superficie di una matrice di gel di silice in presenza di sali caotropici
(in commercio si trovano diversi kit di separazione basati su questo principio).

Il Kit da noi utilizzato e' QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Precipitazione

Per recuperare gli acidi nucleici in soluzione si utilizza:

- etanolo
- isopropanolo (per campioni che devono essere sequenziati)

L'etanolo rimuove il guscio di solvatazione e il DNA precipita perché non è più solubile

Recupero

Il recupero avviene effettuando lavaggi con soluzioni tampone che permettono di eliminare gli eventuali contaminanti





Eluizione e quantizzazione del DNA

L'eluizione del DNA avviene mediante l'uso di un tampone fornito dal kit che permette il distacco dell'acido nucleico dalle colonnine di silice e la sua precipitazione sul fondo della provetta.

La quantificazione del DNA si effettua con l'utilizzo del fotometro che fornisce indicazioni sulla quantità di acido nucleico estratto e sul suo grado di purezza.



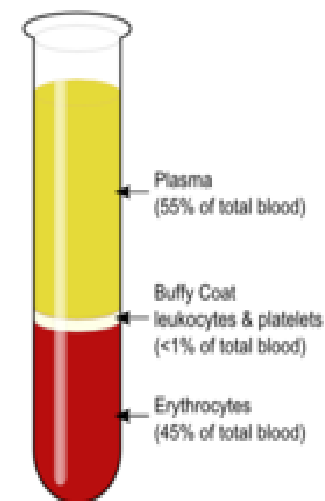
Estrazione del DNA per la ricerca di *Leishmania* spp. da sangue intero/buffy coat/midollo osseo

Metodo di estrazione enzimatico

Prima fase:

centrifugare il sangue
a $2500\text{ g} \times 5'$

prelevare i leucociti
($200\text{ }\mu\text{l}$)





Precauzioni importanti



1. Evitare l' uso di EPARINA come anticoagulante poiché è un inibitore delle PCR
2. I campioni di sangue, dopo il prelievo, possono essere conservati:
 - a temperatura ambiente (15–25°C) per massimo 6 ore
 - a 2–8°C per massimo 24 ore
3. Per la conservazione a lungo termine, si raccomanda di congelare i campioni a –20°C o –80°C.



Seconda fase:

→ Aggiungere 180µl di **Buffer ATL** e 20µl **Proteinase K**;

Proteinasi K:

proteasi della famiglia delle subtilisine isolata dal fungo saprofita *Tritirachium album*: adatta per digestioni che avvengono in tempi brevi, alta e specifica attività che rimane stabile all'aumentare della temperatura e dei valori di pH e non è inibita dalla presenza dei chelanti degli ioni bivalenti come l'EDTA



Buffer ATL:

tampone di lisi necessario per la degradazione delle membrane biologiche.

→ Vortexare e Incubare a 56°C per 10' nel Thermomixer



- Aggiungere 200 µl di **AL**, vortexare e incubare il campione a 70°C per 10'
- Aggiungere 200 µl di **etanolo** (96-100%), vortexare

Buffer AL: tampone di lisi, assicura l'inattivazione delle Rnasi.

Etanolo: rimuove il guscio di solvatazione del DNA che precipita perché non più solubile



Le quantità dei singoli reagenti vanno modificate se varia il volume di partenza del campione



Terza fase:

Trasferire il contenuto della provetta nelle apposite colonnine dotate di portacolonnine.

Centrifugare a 8000 r.p.m. per 1'

Rimuovere il portacolonnine

Effettuare un primo lavaggio con 500 µl di AW1

Centrifugare a 8000 r.p.m. per 1'

Rimuovere il portacolonnine

Eseguire un secondo lavaggio con 500 µl di AW2

Buffer AW1: contiene guanidina cloridrato, denaturante delle eventuali proteine ancora presenti,

Buffer AW2: contiene EtOH al 70%, per eliminare i Sali dalla colonnina ed aiuta nella purificazione del DNA.



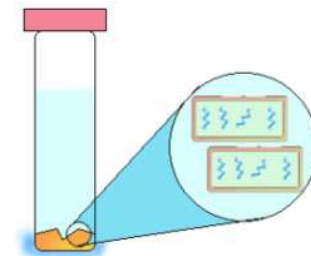
Nel caso le colonnine risultassero visibilmente “sporche” per la presenza di sostanze contaminanti, sarà necessario eseguire più lavaggi



Quarto step: **recupero ed eluizione del DNA**

→ Aggiungere 50 μ l di **AE** a temperatura ambiente
per 5' (ripetere per due volte)

Buffer AE: contiene Tris-Cl 10 mM e EDTA 0.5 mM, distacca il DNA
e ne permette la precipitazione sul fondo della provetta



Sirocco - GNU FDL



Quantificazione dell' acido nucleico

Lettura spettrofotometrica

dosaggio dell'acido nucleico utilizzando i valori di assorbanza in corrispondenza di una lunghezza d'onda (λ) di 260 nm per il DNA, 280 nm per proteine e fenoli, 230 nm per residui di zuccheri, sali e solventi organici e 340 nm per valutare la torbidità della soluzione.

Il rapporto $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ è utilizzato per stimare la purezza della preparazione di acidi nucleici. Il valore ottimale di questo rapporto è pari a 1.8





valori di assorbanza attesi:

A260 nm (dd DNA)	0,1-1,0
A260/280 (contaminanti quali proteine e fenoli)	< 1,7
A260/230 (contaminazione di zuccheri, sali e solventi organici)	> 2,0
A340nm (torbidita' della soluzione)	< 0,0

Se i valori di assorbanza non rientrano nei valori attesi

Effettuare delle diluizioni del campione con acqua distillata

Purificare l'acido nucleico con solventi organici

Riestrarre nuovamente il DNA dal campione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Estrazione del DNA per la ricerca di *Leishmania* spp. da tessuti

Ago aspirato linfonodale

Milza

Raschiato/biopsia cute



Metodo di estrazione: enzimatico/meccanico

Il metodo prevede una prima fase:

Pesare 25 mg di tessuto e trasferirli in una provetta Lysing Matrix D, aggiungendo 500µl di PBS

(Lysing Matrix D: biglie di silice con diametro che varia in base alla matrice da estrarre; provocano la rottura meccanica della parete cellulare)

Porre le provette nell'apparecchio Fast Prep eseguendo 1 ciclo a 6.0 m/s per 40''

(Fast Prep: omogeneizzatore che permette alle biglie di rompere la parete cellulare)



Seconda fase:

Centrifugare a 8000 r.p.m.

trasferire 300µl del surnatante in una provetta da 2 ml

Aggiungere 300µl di Buffer ATL e 30µl di Proteinasi K

Vortexare ed incubare a 56°C per 10'

Aggiungere 300µl di Buffer AL

Vortexare ed incubare a 70°C per 10'

Centrifugare a 8000 rpm per 1'

aggiungere 200µl di etanolo (96-100%)

Centrifugare a 8000 rpm per 1'



Terza fase:

Prelevare tutto il surnatante

trasferirlo nelle apposite colonnine

Centrifugare a 8000 rpm per 1'

Rimuovere il portacolonnine

Effettuare un primo lavaggio con 500 µl di **AW1**

Centrifugare a 8000 r.p.m. per 1'

Rimuovere il portacolonnine

Eseguire un secondo lavaggio con 500 µl di **AW2**

Eluire con 50µl di **AE** (eseguire due incubazioni a t.a.)

Lettura fotometrica



Estrazione del DNA per la ricerca di *Leishmania* spp. da tampone congiuntivale

Prima fase

Il tampone congiuntivale viene posto direttamente nelle provette da 2 ml contenente il tampone **ATL** per 30' a temperatura ambiente.

Successivamente viene aggiunta la **PK** e incubato a 56°C per 10' nel Thermomixer. Continuare l'estrazione seguendo la stessa metodica utilizzata per i tessuti e per il sangue.





Controllo delle estrazioni

- ✓ Lettura fotometrica
- ✓ Controllo interno
- ✓ Gel di agarosio



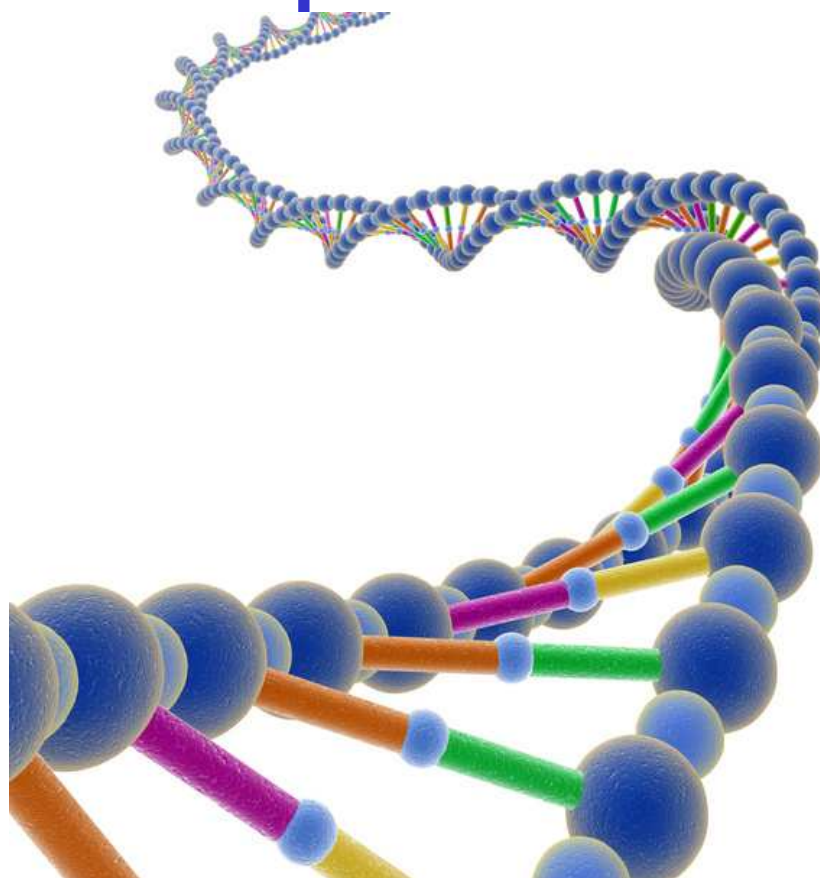
amplificazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Grazie per l'attenzione



LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT

