

PCR tradizionale e Real-Time

nel rilevamento di *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis:
metodiche a confronto



Estrazione acidi nucleici

L'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici sono i primi delicati passi nella maggior parte delle applicazioni di biologia molecolare.

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, essa deve rispondere a due requisiti principali: la *resa* e la *purezza*, intesa sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti.



Il percorso di estrazione e purificazione prevede 4 fasi:

1. Lisi delle cellule

La dissoluzione della cellula (distruzione della membrana) è una fase delicata in quanto risultato di due eventi contrastanti: l'esigenza di frammentare il materiale di partenza e quella di non alterare gli acidi nucleici da analizzare.

I metodi tradizionali di lisi si basano su trattamenti complessi che includono la digestione enzimatica, la solubilizzazione tramite detergente o tecniche meccaniche di spaccatura.



2. Separazione e recupero dell'acido nucleico

Un primo metodo per effettuare tale operazione prevede l'uso di solventi organici (come fenolo o cloroformio), che consentono la separazione degli acidi nucleici dai contaminanti (proteine);

successivamente, dopo centrifugazione, gli acidi nucleici vengono recuperati in soluzione acquosa.

Una seconda metodologia di separazione prevede l'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).

Recentemente sono stati sviluppati protocolli chimici per la separazione e l'isolamento di frammenti di DNA realizzati in un singolo passaggio.



Precipitazione

avviene di solito in etanolo o isopropanolo e
permette il recupero degli acidi nucleici in soluzione

Recupero e quantizzazione

Si effettuano lavaggi con soluzioni tampone e si
recupera il materiale genomico, che viene poi
quantizzato con un metodo fotometrico.



L'ottimizzazione dell'estrazione dipende:

- tipo di acido nucleico che si vuole isolare (per esempio singola o doppia catena di DNA, RNA totale, mRNA...);
- fonte utilizzata per l'estrazione (tessuti animali o vegetali...)
- materiale biologico contenente la fonte degli acidi nucleici usato per l'estrazione (organo intero, sangue, siero, plasma...);
- applicazione prevista post-estrazione (PCR, clonaggio, restrizione enzimatica, Southern blotting...).



Le matrici su cui si effettua l'estrazione per la ricerca di DNA di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) sono:

1. FECI

2. ORGANI/TESSUTI

3. LATTE/COLOSTRO



Estrazione DNA da FECI

- Pesare 1 g di feci e trasferirle in un tubo Falcon da 50 ml;
 - Aggiungere 20 ml di H₂O distillata sterile e vortexare, lasciando poi riposare il campione per 15-20 min.;
 - Prelevare 300µl del surnatante e trasferirli in una provetta **Lysing Matrix D**, aggiungendo poi 200µl di H₂O distillata sterile;
- (**Lysing Matrix** sono biglie di silice con diametro che varia in base alla matrice da estrarre, che permettono rottura meccanica della parete cellulare del MAP);*
- Porre le provette nell'apparecchio **Fast Prep** eseguendo 3 cicli da 4 m/s per 45'';

*(il **Fast Prep** è un omogenizzatore che permette alle biglie di rompere la parete batterica)*



- Centrifugare l'omogenato a 8000 rpm per 1' e da qui in poi inizia la fase di separazione del DNA;
- Aggiungere 180µl di **Buffer AL** 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
- non è inibita dalla presenza dei chelanti degli ioni bivalenti come l'EDTA

Buffer AL:

tampone di lisi necessario per la degradazione delle membrane biologiche



- Incubare il campione a 70°C per 10' e successivamente centrifugare a 8000 rpm per 1' per eliminare la condensata;



(l'incubazione serve per attivare la **proteinase K** e far avvenire la digestione enzimatica nelle condizioni di massima efficienza possibile);

- Aggiungere 210µl di **etanolo assoluto**, vortexando e centrifugare nuovamente;

(L'etanolo rimuove il guscio di solvatazione del DNA che precipita perchè non è più solubile)

- Trasferire il contenuto della provetta nelle apposite colonnine d'eluizione;



- Dopo centrifugazione si elimina il porta colonnina e la provetta viene posta su una nuova colonnina d'eluizione;
- Effettuare il primo lavaggio con 500µl di **Buffer AW1**, centrifugare e sostituire porta colonnina;
- Eseguire il secondo lavaggio 500µl di **Buffer AW2**, centrifugare e sostituire porta colonnina;
(il **Buffer AW1** contiene guanidina cloridrato, denaturante delle eventuali proteine ancora presenti, mentre l'AW2 contiene EtOH al 70%, per eliminare i Sali dalla colonnina ed aiuta nella purificazione del DNA)
- Eluizione del DNA aggiungendo 100µl di **Buffer AE**, incubando 5' a t.a. e centrifugare (ripetere passaggio per 2 volte)
(il **Buffer AE**, formato da 10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA, distacca il DNA e permette la precipitazione sul fondo della provetta).



Quantificazione del DNA

Lettura fotometrica per valutare effettiva presenza di materiale genomico e la sua purezza

La concentrazione del DNA si ricava dalla Assorbanza a 260nm utilizzando la legge di Lambert-Beer

Per determinare la concentrazione del DNA si applica:

$$[\text{DNA}]_{\text{ug/ml}} = \frac{A_{260} \times 50 \text{ug/ml}}{1 \text{Unità assorbimento}} \times \text{fattore di diluizione}$$



La **A260** consente di calcolare la concentrazione di AN tenendo presente che 1 unità di A260 corrisponde a **50 mg/ml** di DNA a doppia elica, a **40 mg/ml** di DNA ad elica singola.

L'assorbimento a **280 nm** si utilizza per valutare il grado di purezza della preparazione: se il rapporto A260/A280 è tra **1,7 e 1,9**, la preparazione è priva di contaminanti significativi.

Se invece questi rapporti scendono al di sotto di 1,6 la preparazione è contaminata in maniera significativa , in genere con proteine.

- Azzerare lo strumento ed effettuare la lettura del bianco con una cuvetta contenente 60µl di Buffer AE;
- Porre nelle apposite cuvette per lettura fotometrica 60µl di DNA;
- Effettuare la lettura;

Se il campione risulta inibito si può effettuare una diluizione (es. 1:10, 10µl DNA e 90µl di H₂O distillata).



Estrazione DNA da organi-tessuti

Trattamento grossolano dei campioni:

INTESTINO:

- sciacquare campione in H₂O sterile;
- Dissezionare tramite bisturi e ripulire la mucosa da eventuali residui fecali;
- Raschiare mucosa e pesare 25 mg di omogenato.

LINFONODO, ILEO, VALVOLA ILEO-CECALE:

- Tagliare sezione del campione (tratto lesione tipica);
- Raschiare mucosa eliminando parti grasse e connettivali tramite bisturi;
- Pesare 25 mg di omogenato.



- Trasferire 25 mg di tessuto omogenato in provetta da 2 ml ed aggiungere 180µl di **Buffer ATL** e 20µl di **Proteinase K**;
- Vortexare ed incubare a 56°C overnight;
- Vortexare ed incubare a 70°C per 10';
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'ed aggiungere 200µl di etanolo assoluto;
- Prelevare tutto il volume di reazione e trasferirlo nelle apposite colonnine d'eluizione;
- Dopo centrifugazione di elimina il porta colonnina e la provetta viene posta su una nuova colonnina d'eluizione.



- Effettuare il primo lavaggio con 500µl di Buffer AW1, centrifugare e sostituire porta colonnina;
- Eseguire il secondo lavaggio 500µl di Buffer AW2, centrifugare e sostituire porta colonnina
- Eluizione del DNA aggiungendo 100µl di Buffer AE, incubando 5' a t.a. e centrifugare (ripetere passaggio per 2 volte);
- Effettuare la lettura fotometrica.



Estrazione DNA da latte-colostro

La procedura si suddivide in 2 fasi:

FASE DI PREPARAZIONE:

- Porre il campione di latte/colostro a 4°C per 18-20 h per separare lo strato di grasso superficiale;
- Eliminare lo strato di grasso formatosi con l'aiuto di una spatola e prelevare 10 ml di latte/colostro sottostante.



Estrazione DNA da latte-colostro

FASE DI ESTRAZIONE:

- Ai 10 ml di latte-colostro aggiungere 1 ml di Buffer LO e vortexare;
 - Porre il campione in agitazione sul ROTATOR SB3 per 10';
 - Aggiungere 50 μ l di biglie magnetiche;
 - Miscelare le biglie magnetiche mediante agitazione a 10 rpm per 30';
- (le biglie di vetro sono trattate per adsorbire il DNA e sono rese magnetiche perché ricoperte con ossido di ferro)



Estrazione DNA da latte-colostro

- Porre il campione a contatto con il magnete per recuperare il complesso biglie magnetiche-DNA;
- Risospendere il complesso con 800 μ l di LISIS Buffer L1 e 50 μ l di LISIS Buffer L2;
- Centrifugare a 10000 rpm per 1' e trasferire il pellet (biglie magnetiche-DNA) in una provetta da 2 ml;
- Effettuare una prima incubazione a 70°C per 10' ed una seconda a 95°C per 1 h;
- Vortexare e mettere a contatto il campione con il magnete per 5';
- Recuperare il surnatante (DNA) ed effettuare la lettura fotometrica.

