

## **Giornate di aggiornamento sulle procedure di Microbiologia degli Alimenti**

### **II Modulo:**

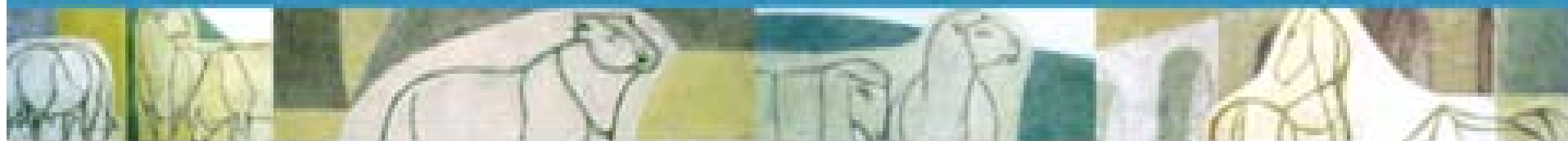
### **Impiego dei metodi molecolari nella sicurezza alimentare**



*Applicazione delle metodiche molecolari alla sicurezza alimentare:  
principi di base e criticità.*

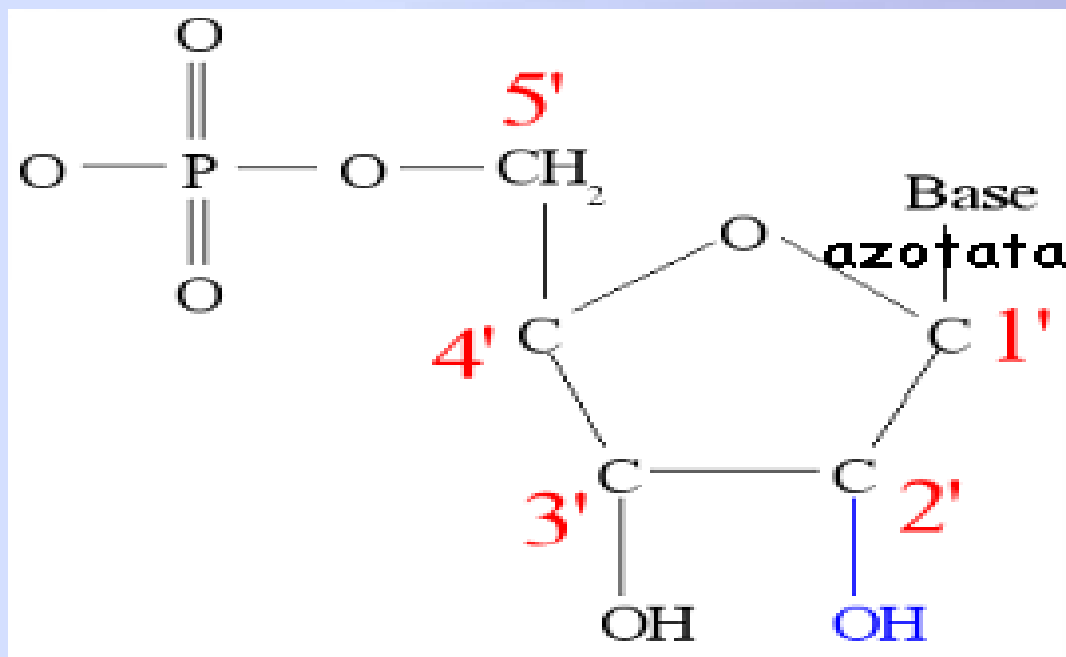
**4-5 maggio 2017**

**Laura De Santis**



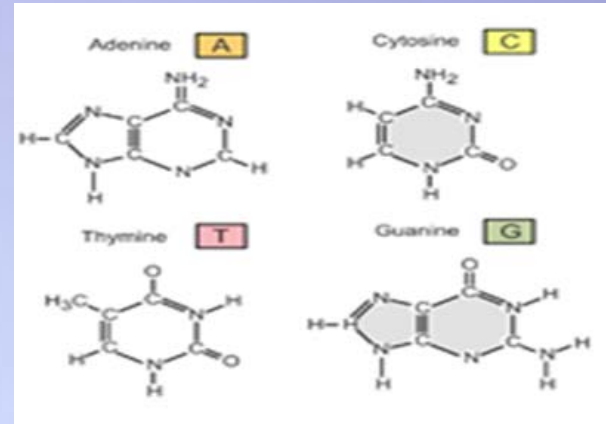
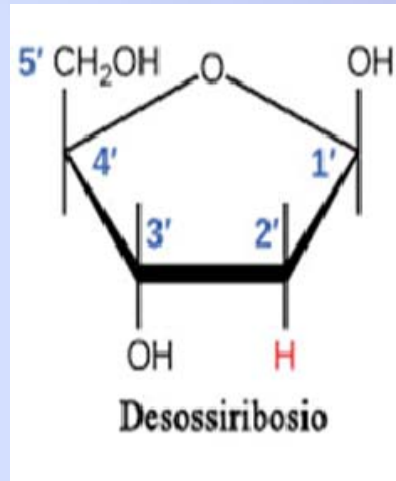
# Basi chimiche: ACIDI NUCLEICI DNA e RNA

## POLIMERI DI NUCLEOTIDI: GRUPPO FOSFATO-ZUCCHERO –BASE AZOTATA

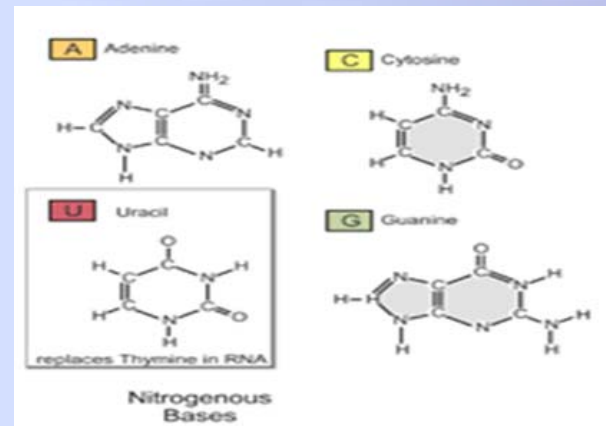
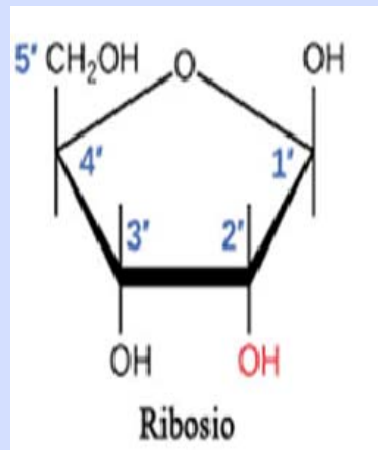


# DNA Vs RNA

**DNA**



**RNA**



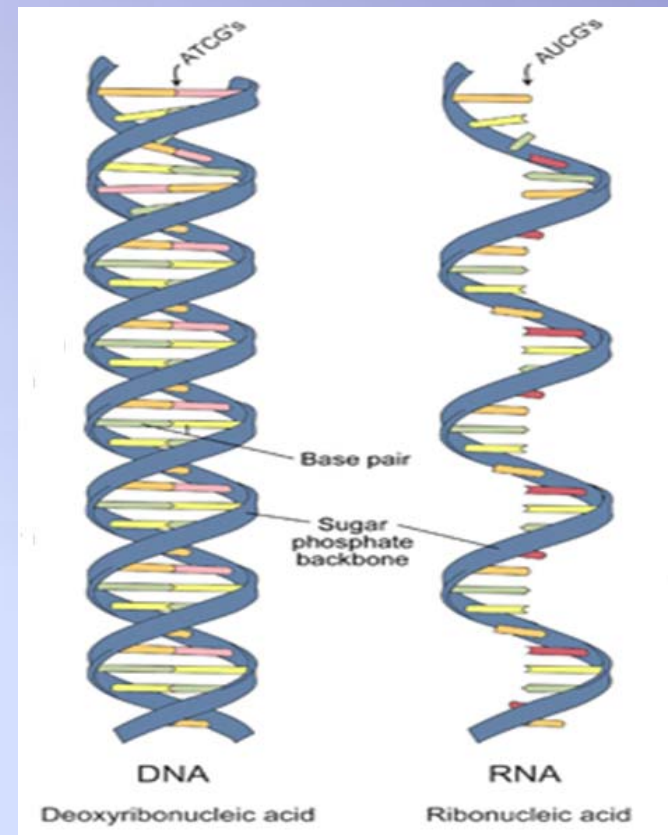
# DNA Vs RNA

## DNA

- DOPPIO FILAMENTO
- CONTIENE IL CODICE GENETICO.
- PERPETUA L'INFORMAZIONE GENETICA ATTRAVERSO LA **DUPLICAZIONE**

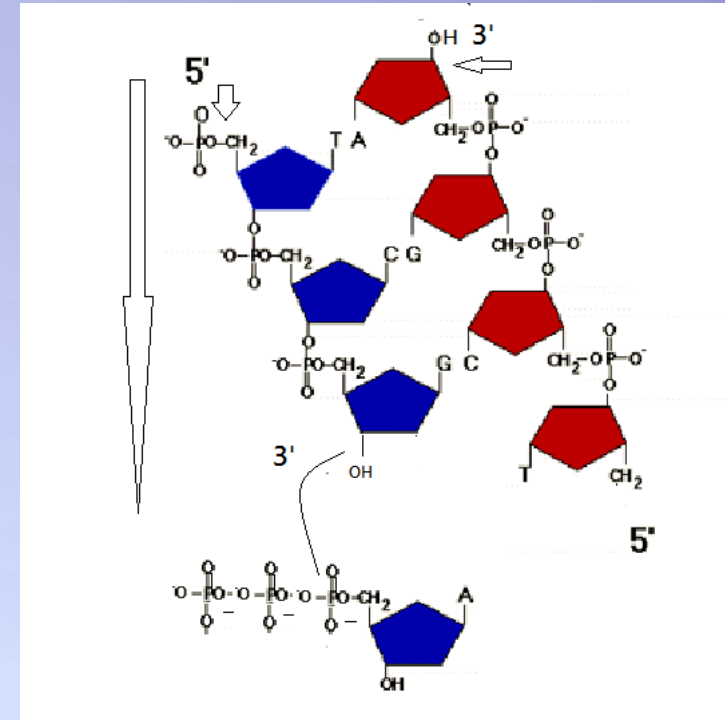
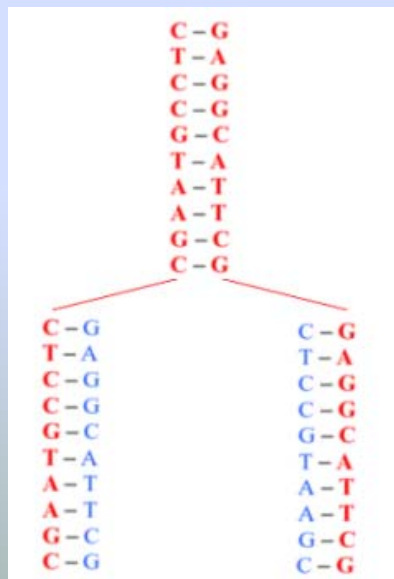
## RNA

- SINGOLO o DOPPIO FILAMENTO
- (mRNA) DERIVA DALLA TRASCRIZIONE DEL DNA ;
  - IL MESSAGGIO E' TRADOTTO IN **SINTESI PROTEICA** (tRNA- rRNA)



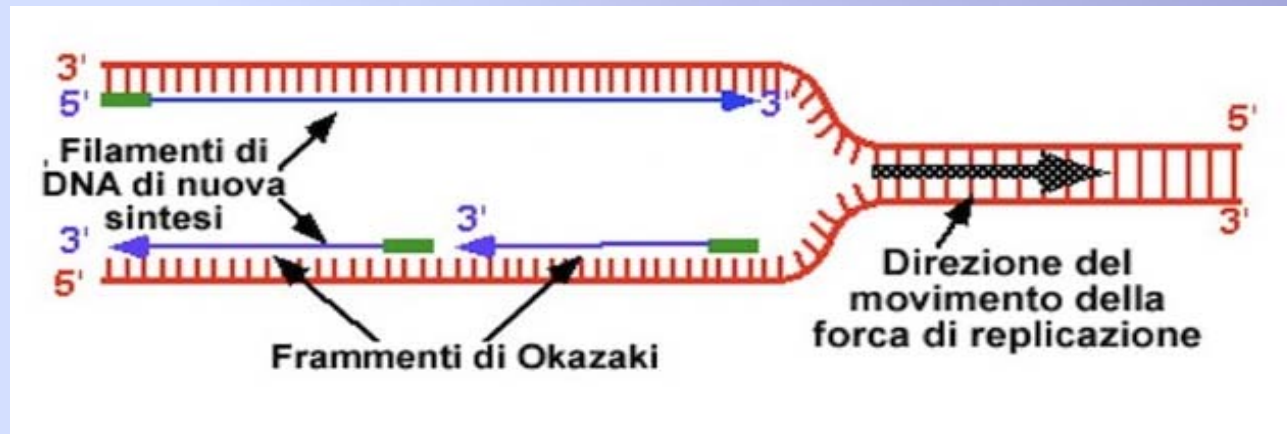
# I NUMERI DEL DNA 5'-3'

LA DUPLICAZIONE DEL DNA E' SEMICONSERVATIVA: I DUE FILAMENTI DI DNA PARENTALE FUNGONO DA STAMPO PER LA FORMAZIONE DI DUE FILAMENTI COMPLEMENTARI DI NUOVA SINTESI



LA DNA POLIMERASI CATALIZZA L'AGGIUNTA DEL NUCLEOTIDE ALLA CATENA DEL DNA IN DIREZIONE 5' -3' LIBERANDO **PIROFOSFATO (PP)**

# DUPLICAZIONE DEL DNA



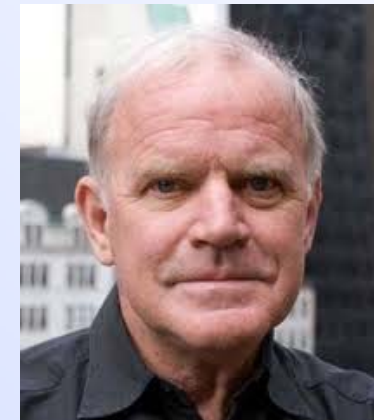
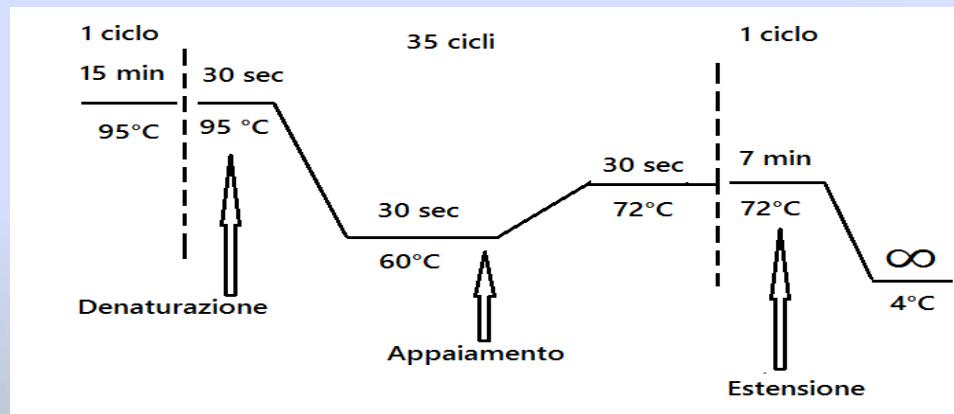
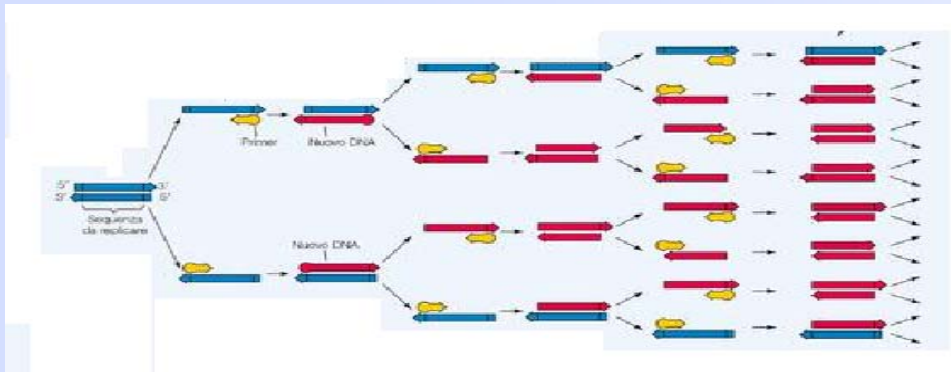
## DUPLICAZIONE NEI PROCARIOTI- ENZIMI COINVOLTI

1) TOPOISOMERASI; 2) PROTEINE INIZIATRICI; 3) DNA ELICASI ; 4) PROTEINE SBB 5) DNA PRIMASI → SINTESI DI RNA PRIMER; 6) DNA POLIMERASI III; 7) DNA POLIMERASI I E DNA LIGASI

- LA SINTESI DEL NUOVO FILAMENTO DI DNA AVVIENE IN DIREZIONE 5'-3':
- LA DUPLICAZIONE E' PERTANTO CONTINUA SUL FILAMENTO LEADING E DISCONTINUA SUL FILAMENTO LAGGING

# DUPLICAZIONE DEL DNA IN VITRO

## PCR (Polymerase Chain Reaction)



Kary Banks Mullis

Premio Nobel  
per la Chimica  
1993

# Kary Mullis

## The bad boy of science

*What if I had not taken LSD  
ever; I would have still  
invented PCR? I do not know.  
I doubt it. I seriously doubt it.*



***Dancing naked in the Mind Field  
By K. Mullis***



# Gli “ingredienti” della PCR

- DNA target;
- DNA Polimerasi termostabile (Taq Polimerasi);
- Primer Forward e Reverse (corti oligonucleotidi che fungono da innesco per la DNA polimerasi);
- dNTPs : miscela di dATP, dCTP, dGTP, dTTP collettivamente indicati come dNTP (desossiribonucleoside-triphosphate);
- Ioni Mg ++

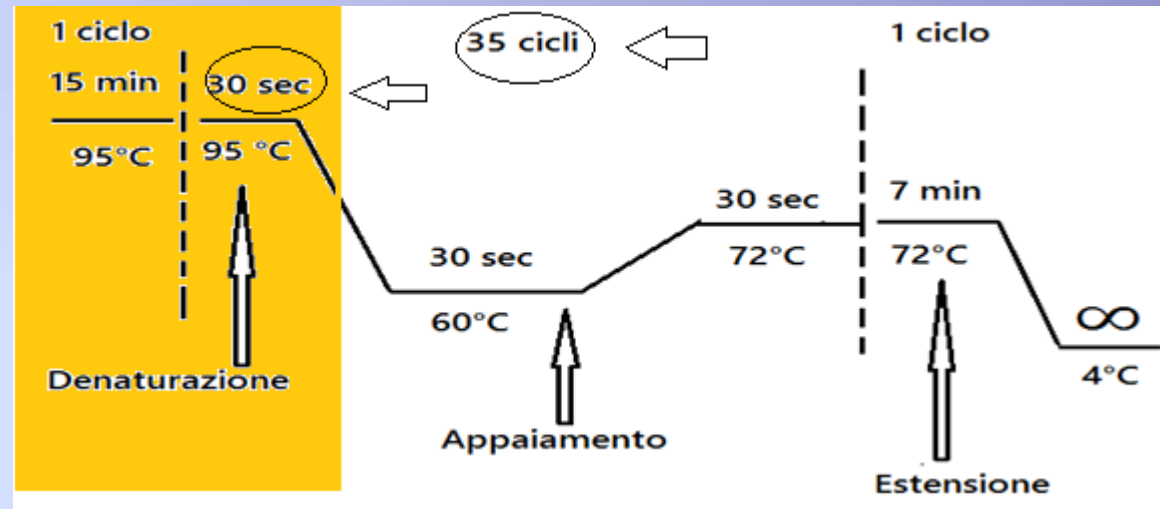
# Componenti della PCR: caratteristiche

- **Buffer di reazione:**
    - 10-50mM Tris-HCl pH 8.3 (diminuisce a 7.2 in fase di reazione- pH per l'attività enzimatica della polimerasi )
    - fino a 50mM KCl (favorisce l'appaiamento del primer)
    - **1.5mM o più di MgCl<sub>2</sub>** (gli ioni magnesio agiscono da cofattori per la polimerasi formano complessi solubili con i dNTP; la concentrazione influenza l'appaiamento dei primer allo stampo)
    - **200μM di ciascun deossiribonucleotide (dNTP)**
    - gelatina o BSA (siero albumina bovina) fino a 100μg/ml
    - (la Taq è idrofoba e tende a precipitare in sol. Acquosa, l'albumina funge da stabilizzante)
  - **Taq polimerasi** : possiede attività esonucleasica in direzione 5'-3' ma non in direzione 3'-5'. L'accuratezza è di circa 1 errore ogni 10.000 nucleotidi aggiunti
  - **Primers** : non troppo lunghi per evitare il legame in siti aspecifici
-

# I PARAMETRI DELLA PCR (1)

## 1° FASE : DENATURAZIONE

**T<sub>m</sub> (melting temperature):**  
temperatura alla quale la metà  
delle molecole è in forma di  
doppia elica stabile.



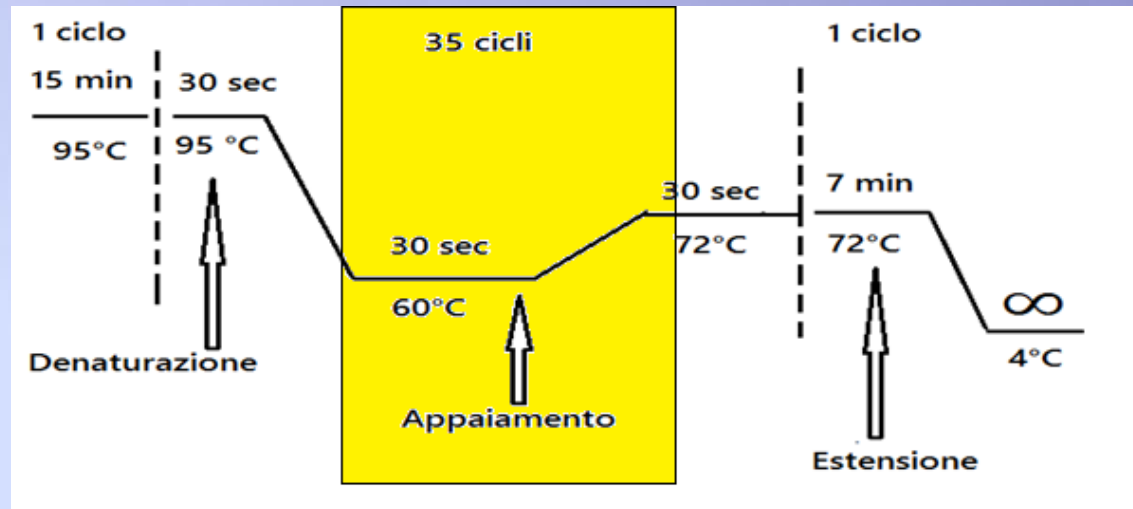
- PER SEPARARE I FILAMENTI E' NECESSARIO FORNIRE UNA TEMPERATURA SUPERIORE ALLA  $T_m$  ;
- LA Taq POLIMERASI HA UNA EMIVITA DI CIRCA 30 MINUTI A 95 °C . QUESTO LIMITA IL TEMPO ED IL NUMERO DI CICLI . DIMINUENDO IL TEMPO DI DENATURAZIONE A 15-30 SECONDI I CICLI POSSONO ESSERE AUMENTATI.

# I PARAMETRI DELLA PCR (2)

## 2° FASE ANNEALING

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

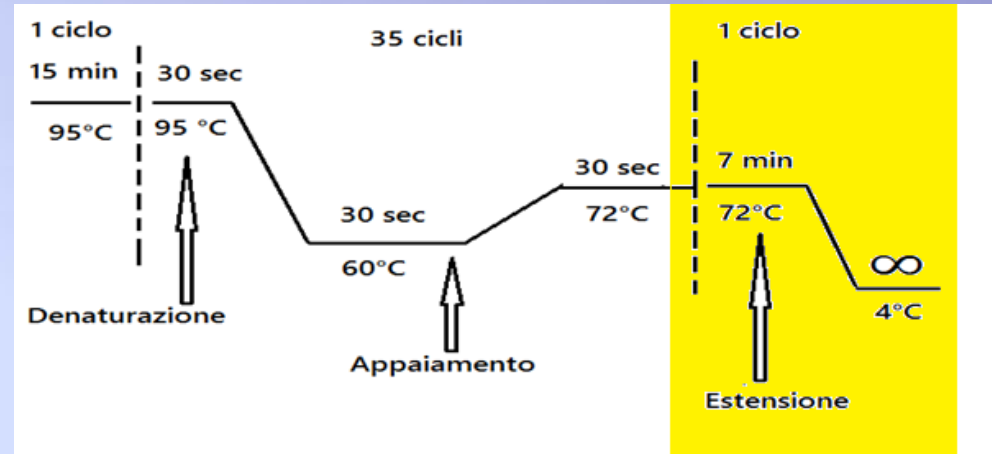
$$T_a = T_m - 5^\circ C$$



- ***T<sub>a</sub>*** TROPPO BASSA : ANNEALING DEI PRIMER A SEQUENZE NON ESATTAMENTE COMPLEMENTARI
- ***T<sub>a</sub>*** TROPPO ALTA : POCHE MOLECOLE DI PRIMER RIUSCIRANNO AD INNESCARE LA POLIMERASI A CAUSA DELL'INSTABILITA' DEL LORO APPAIAMENTO CON IL DNA STAMPO
- LA ***T<sub>a</sub>*** PUO' RIMANERE COSTANTE OPPURE DIMINUIRE CICLO DOPO CICLO (TOUCH DOWN)
- IL **TEMPO** NON DEVE ESSERE TROPPO LUNGO PER SFAVORIRE APPAIAMENTI A BASSA COMPLEMENTARIETA'

# I PARAMETRI DELLA PCR (3)

## 3° FASE ESTENSIONE



LA Taq POLIMERASI POSSIEDE ATTIVITA' ENZIMATICA A 37 °C MA HA IL SUO MASSIMO INTORNO A 70 °C

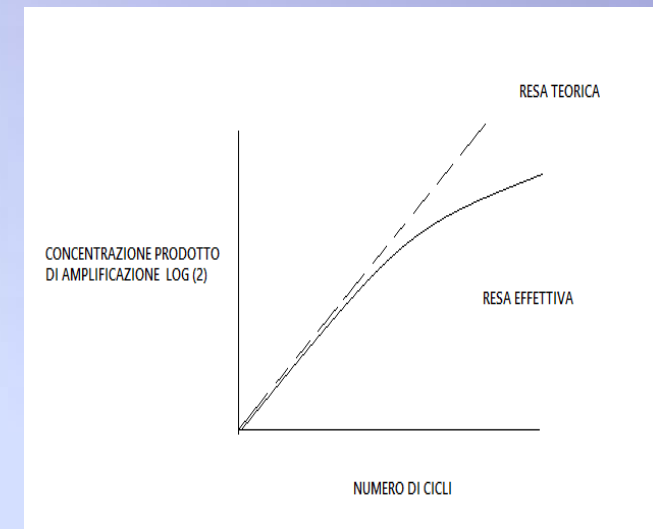
IL TEMPO E' CALIBRATO SULLA LUNGHEZZA DELLO STAMPO DA AMPLIFICARE

# I PARAMETRI DELLA PCR (IV)

**Numero di cicli** : il numero di cicli necessari per la rilevazione del DNA è legato alla quantità di DNA iniziale. L'effetto del numero di cicli, tuttavia, non è proporzionale a causa dell'effetto “plateau”.

## EFFETTO PLATEAU

- DEGRADAZIONE DEI REAGENTI (dNTP, POLIMERASI);
- ACCUMULO DI PIROFOSFATO (INIBIZIONE DA PRODOTTO).



# PRIMERS : STRUTTURE SECONDARIE E FORMAZIONE DI DIMERI

LA PRESENZA DI STRUTTURE SECONDARIE INTRA O INTERMOLECOLARI NEI PRIMER ABBASSA LA RESA DI AMPLIFICAZIONE.

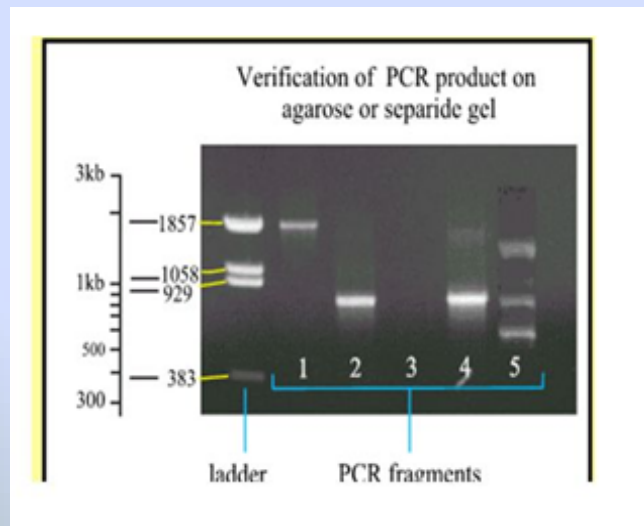
- **STRUTTURA AD HAIRPIN:** IL SINGOLO PRIMER SI RIPIEGA SU SE STESSO FORMANDO UNA FORCINA (L'OSSIDRILE NON E' PIU' DISPONIBILE PER LA POLIMERIZZAZIONE)
- **SELF DIMER :** DUE MOLECOLE DI PRIMER DELLO STESSO TIPO SI ASSOCIANO NEI PUNTI IN CUI IL PRIMER E' OMOLOGO A SE STESSO
- **CROSS DIMER:** DUE MOLECOLE DI PRIMER DI TIPO DIVERSO SI ASSOCIANO NELLE REGIONI DI OMOLOGIA DI SEQUENZA

I METODI “ HOT START “ RIDUCONO LA POSSIBILITA' DI FORMAZIONE DEI DIMERI.

# TIPI DI PCR (1)

## PCR “END POINT”

Alla fine della reazione di amplificazione una aliquota di DNA è sottoposta ad analisi elettroforetica per verificare il peso molecolare (bp) mediante confronto con il controllo positivo ed utilizzo di frammenti di DNA a dimensione nota (ladder) quale riferimento dimensionale .



### VANTAGGI

- **Sensibile**
- **Robusta : permette di analizzare DNA di bassa qualità**

### SVANTAGGI

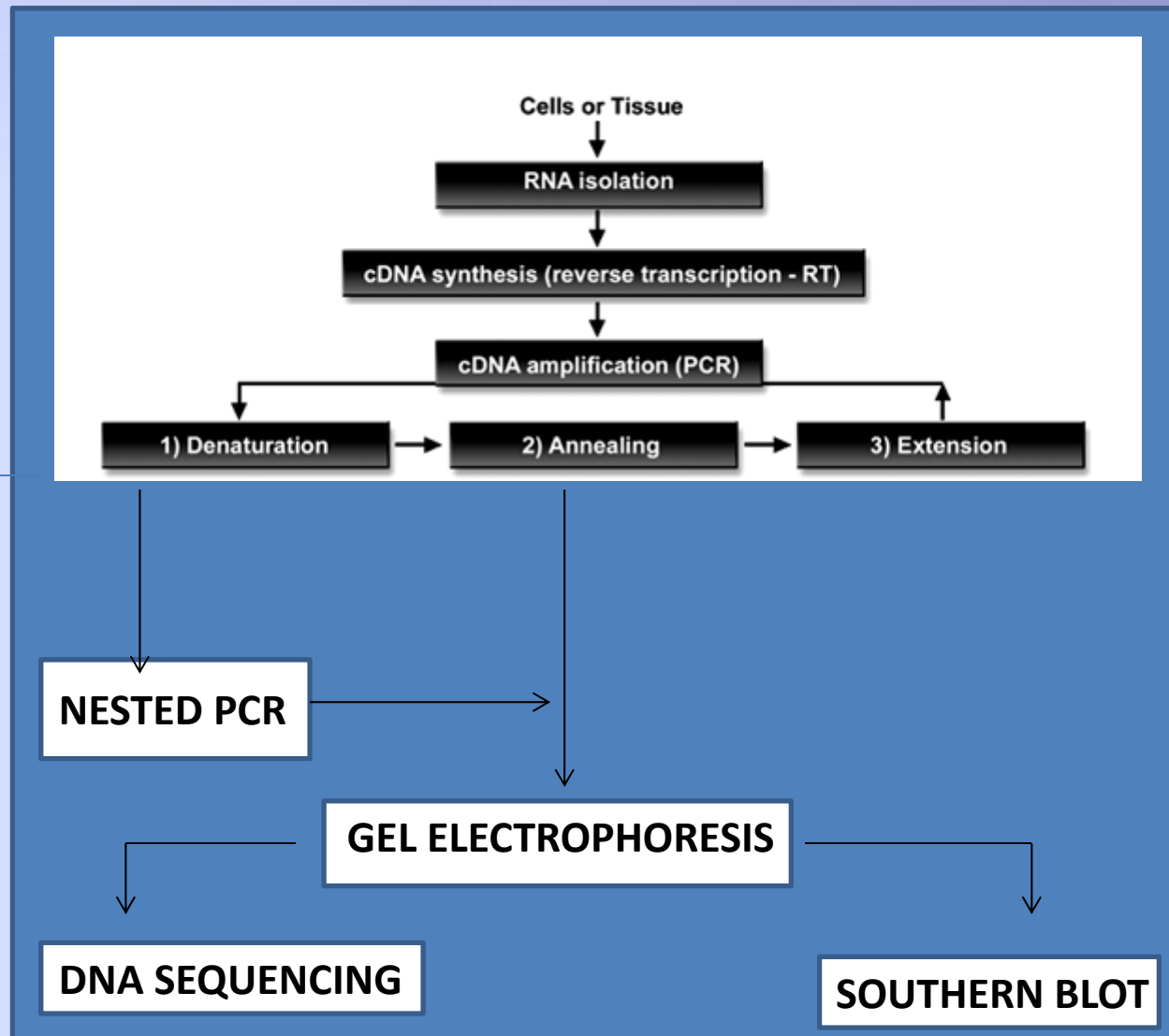
**Alla fine della reazione di amplificazione la quantità di amplificato non è più proporzionale alla concentrazione iniziale del campione**



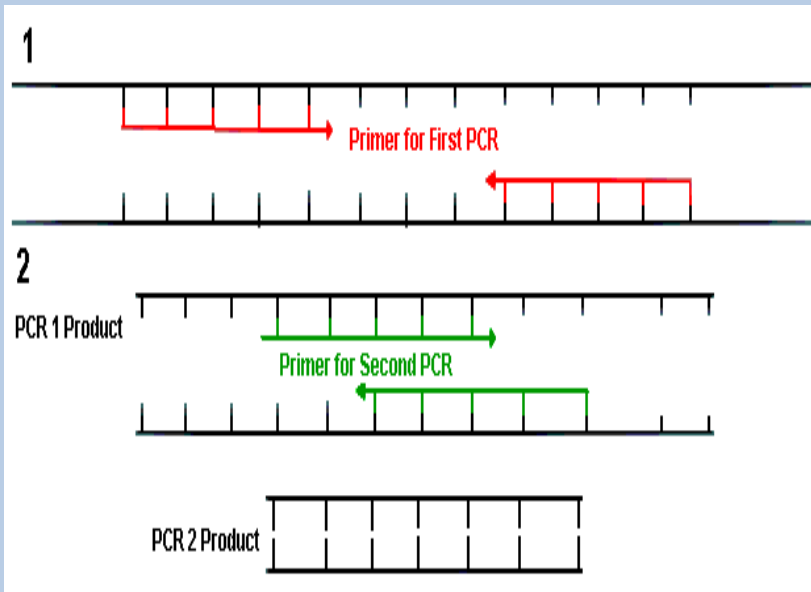
# Reverse Transcription PCR (2)

*E' UTILIZZATA PER  
VALUTARE  
L'ESPRESSIONE GENICA  
OPPURE PER RILEVARE  
LA PRESENZA DI VIRUS  
AD RNA .*

**PCR REAL TIME**



# NESTED PCR (3)



E' UNA VARIANTE DELLA PCR END POINT .  
PREVEDE DUE DISTINTE E SUCCESSIVE  
REAZIONI DI AMPLIFICAZIONE

1.NELLA PRIMA AMPLIFICAZIONE SI  
UTILIZZANO PRIMERS PIU' ESTERNI AL  
FRAMMENTO DA AMPLIFICARE

2.NELLA SECONDA AMPLIFICAZIONE SI  
UTILIZZANO PRIMERS CHE AMPLIFICANO UN  
FRAMMENTO INTERNO A QUELLO  
AMPLIFICATO NELLA PRIMA REAZIONE

## VANTAGGI

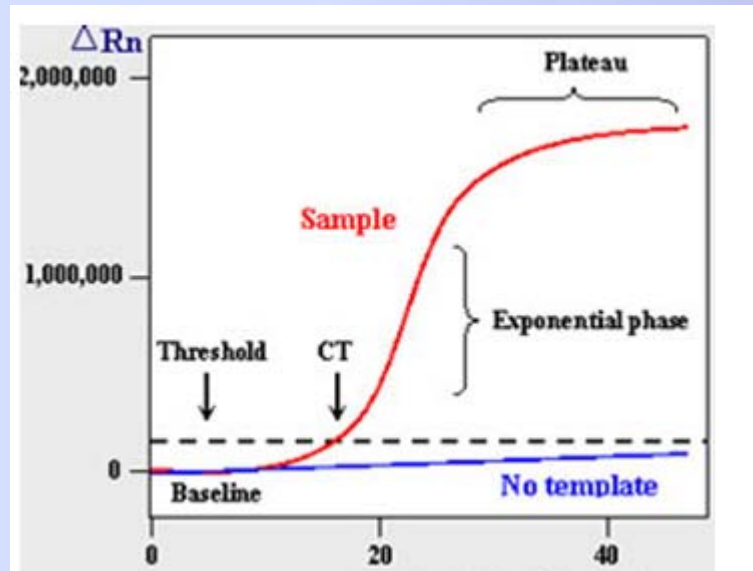
- AUMENTA LA SPECIFICITA'

## SVANTAGGI:

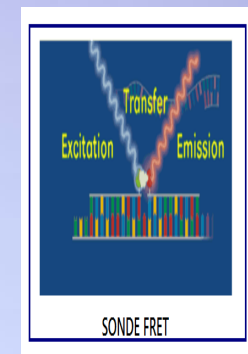
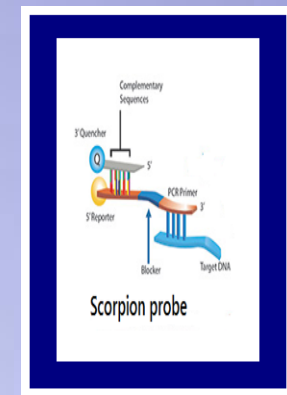
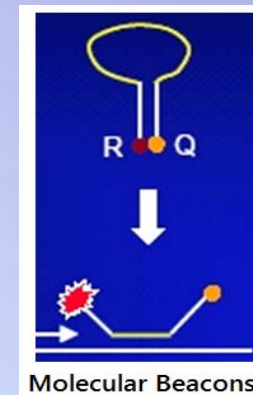
- TEMPI DI ESECUZIONE MAGGIORI;
- COSTOSA ;
- AUMENTO DEL RISCHIO DI CONTAMINAZIONE  
DEI CAMPIONI DA "CARRY OVER"

# qPCR Real Time (4)

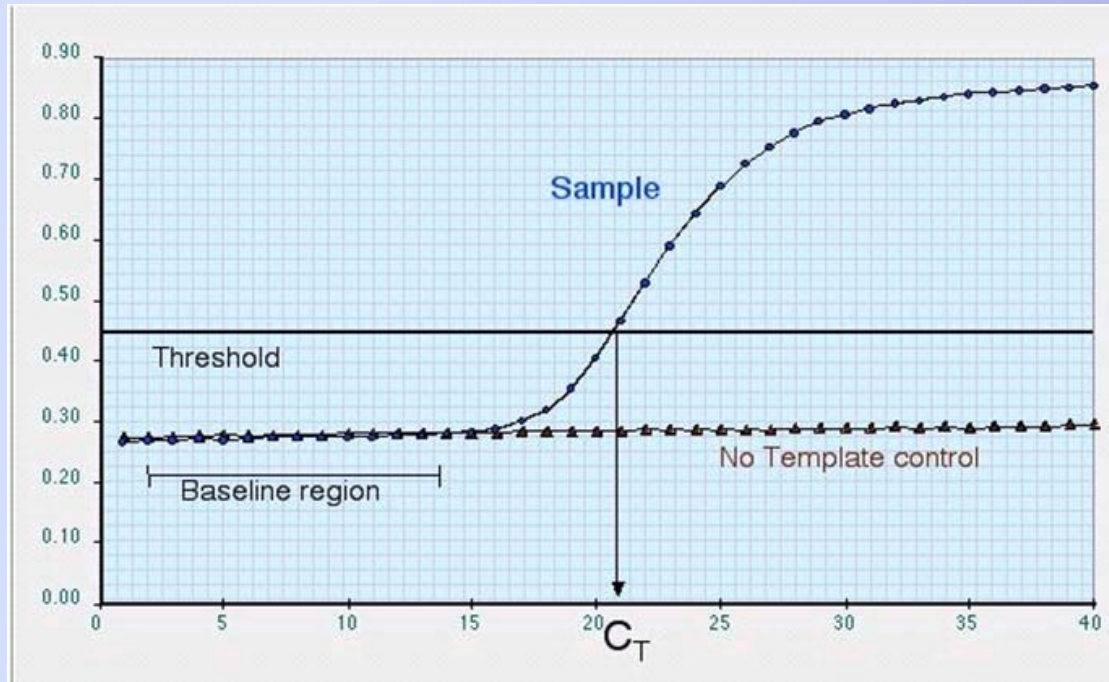
**MISURA LA FLUORESCENZA  
L'AMPLIFICAZIONE DEL DNA IN TEMPO  
REALE DURANTE LA FASE  
ESPONENZIALE.**



LA FLUORESCENZA E' GENERATA DA  
COLORANTI INTERCALANTI (AD.ES.  
SYBR GREEN) CHE SI LEGANO IN  
MANIERA ASPECIFICA A TUTTO IL  
DNA, OPPURE DA SONDE SPECIFICHE  
PER IL GENE DI INTERESSE MARCATE  
CON FLUOROCROMI

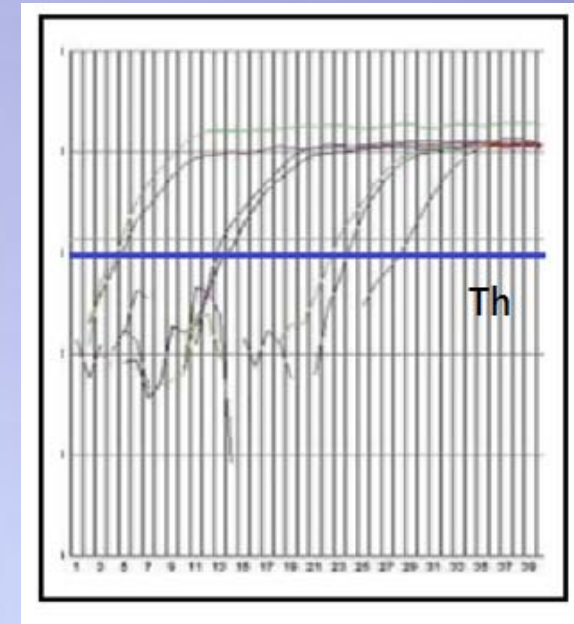


# qPCR Real Time



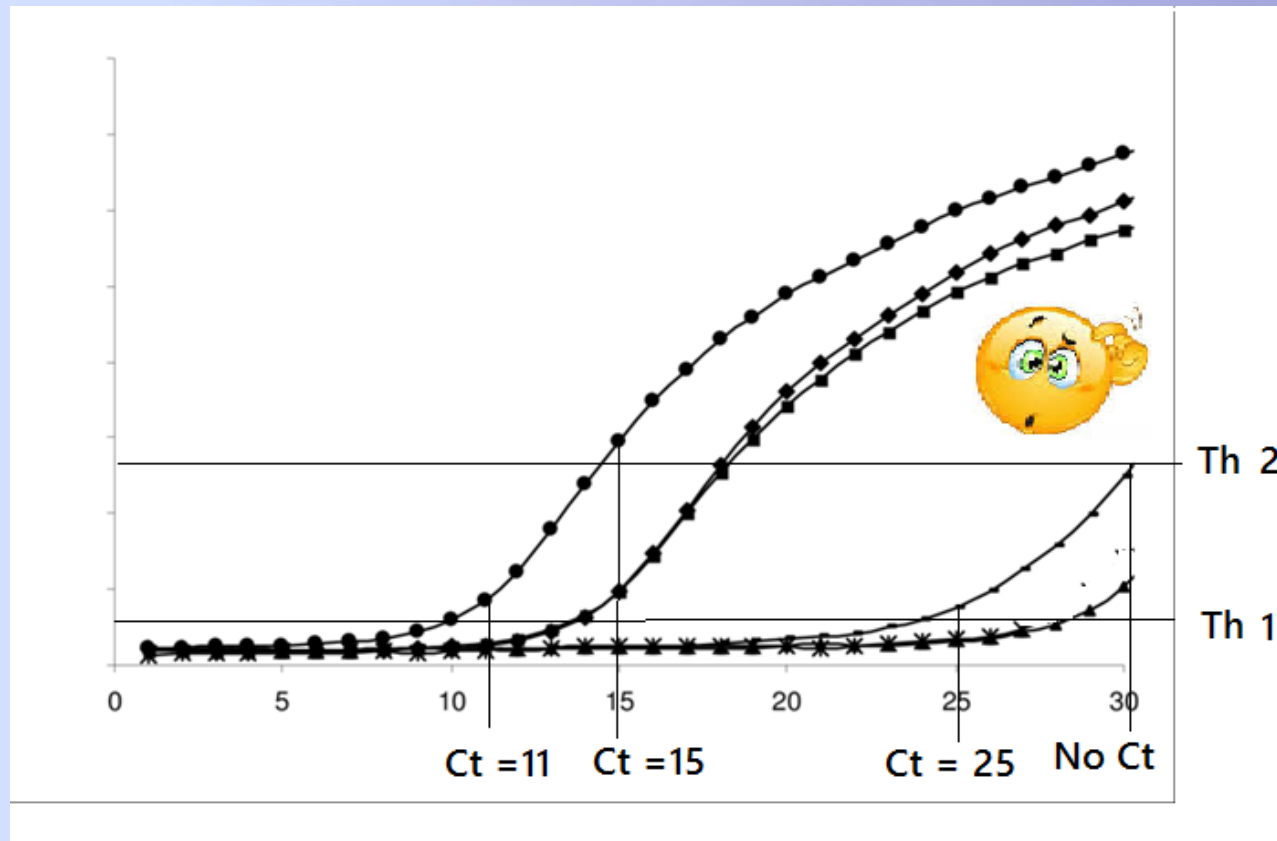
**Linea di base (baseline):** valore al di sopra del quale inizia il segnale prodotto dall'amplificato

**Ciclo soglia:** E' il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold



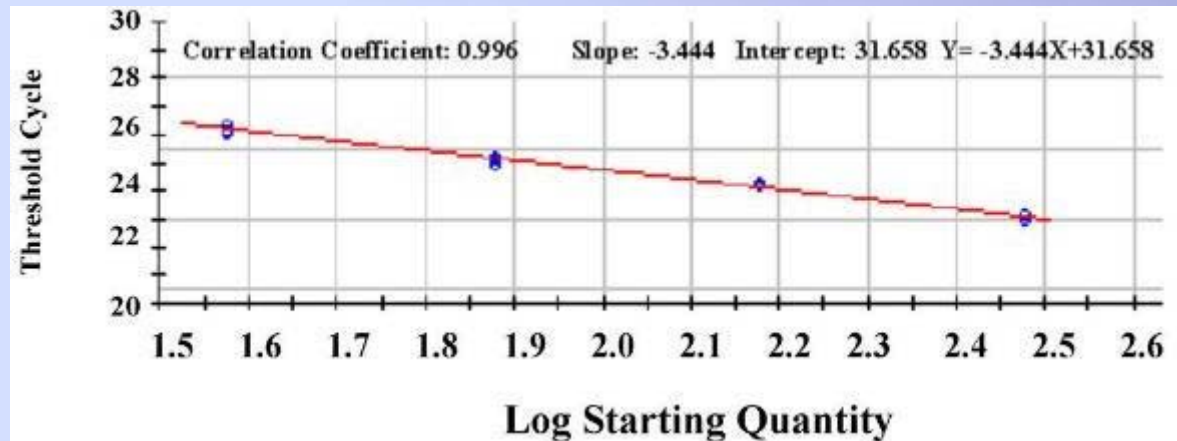
**Linea soglia (Threshold):** scelta dall'operatore in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale

# qPCR Real Time



- IL VALORE DEL CICLO SOGLIA (Ct) E' INVERSAMENTE PROPORZIONALE ALLA QUANTITA' DI TEMPLATO INIZIALE;
- IL VALORE DEL CICLO SOGLIA CALCOLATO DIPENDE DALLA THRESHOLD IMPOSTATA

# qPCR Real Time : Quantificazione

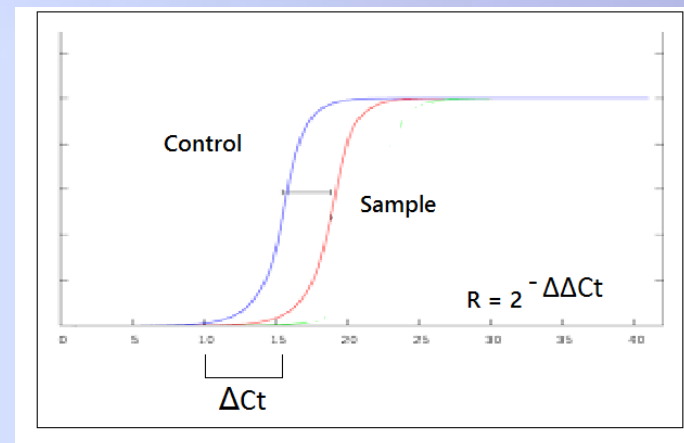


$$E = \left( 10^{-\frac{1}{\text{slope}}} \right) - 1$$

$r^2$  ( Goodness of fit )

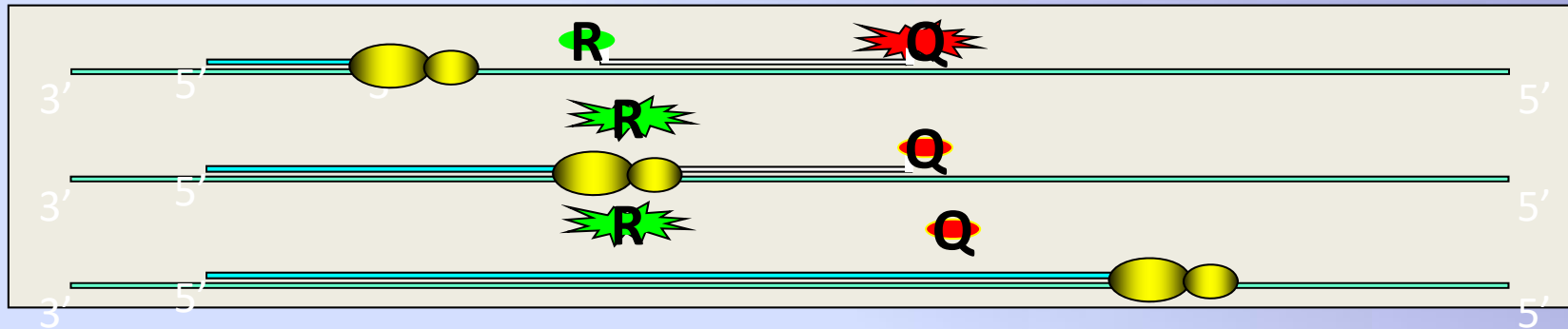
**ASSOLUTA** : NECESSITA DI STANDARD A CONCENTRAZIONE NOTA  
(UTILIZZO DI UNA CURVA STANDARD)

**RELATIVA** : I CAMPIONI SONO  
“QUANTIFICATI” PARAGONANDO IL LORO  $\Delta C_t$   
CON QUELLO DEL CONTROLLO ENDOGENO  
(NON SI UTILIZZA LA CURVA STANDARD)



# CHIMICA DELLA PCR REAL TIME (1)

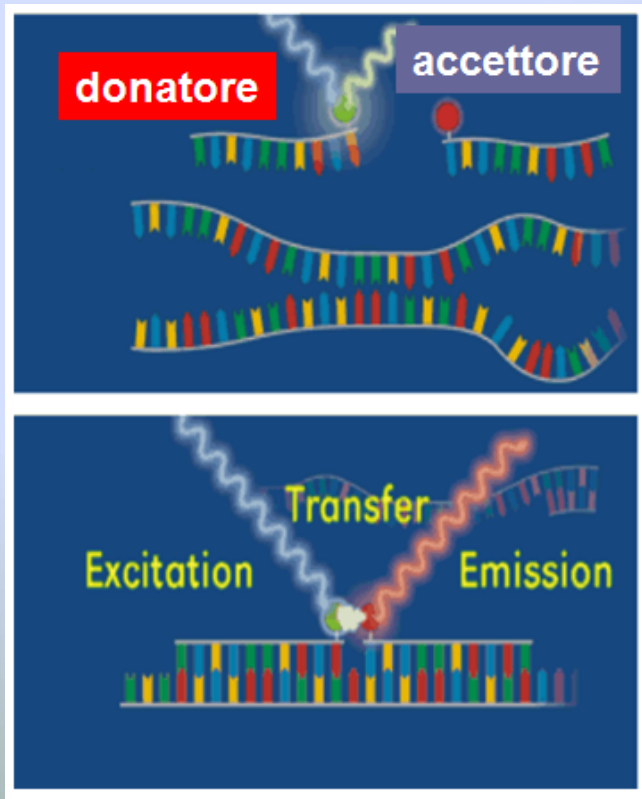
## SONDE A IDROLISI (TaqMan)



- 1) LA SONDA E' DISEGNATA PER IBRIDARSI CON LA SEQUENZA TARGET
- 2) QUANDO SONO VICINI, I FOTONI EMESSI DAL FLUOROFORO REPORTER SONO ASSORBITI DAL FLUOROFORO QUENCHER
- 3) DURANTE LA FASE DI ELONGAZIONE L' ATTIVITA' ESONUCLEASICA DELLA POLIMERASI SCINDE LA SONDA CON EMISSIONE DI FLUORESCENZA DEL REPORTER

# SONDA FRET (2)

## (Fluorescence Resonance Energy Transfer)



DURANTE LO STEP DI ANNEALING ENTRAMBE LE SONDE IBRIDIZZANO ALLE SEQUENZE TARGET:

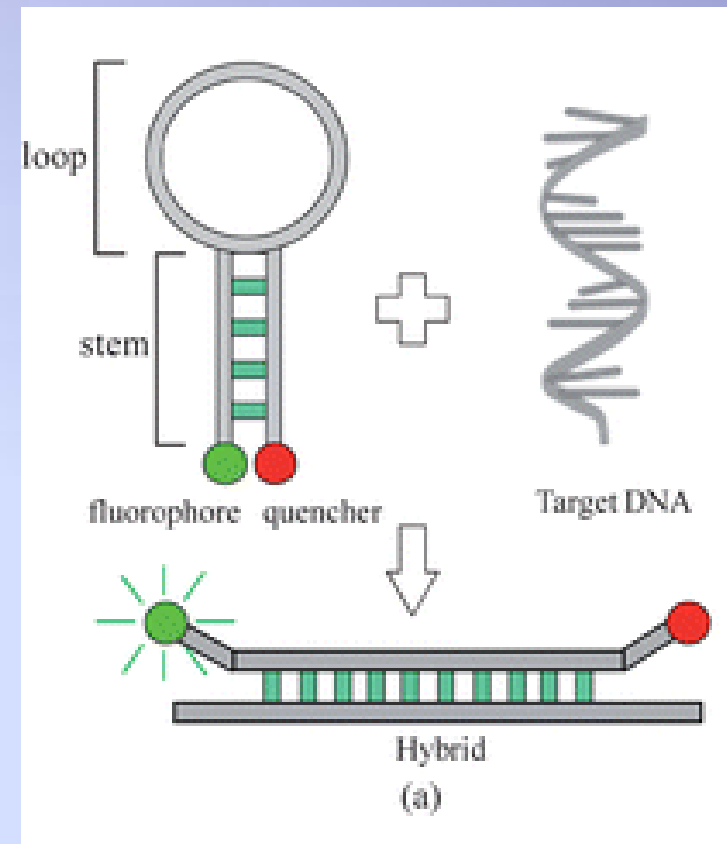
CIO' AVVICINA IL FLUOROFORO DONATORE ALL'ACCETTORE CON TRASFERIMENTO DI ENERGIA ED EMISSIONE DI FLUORESCENZA



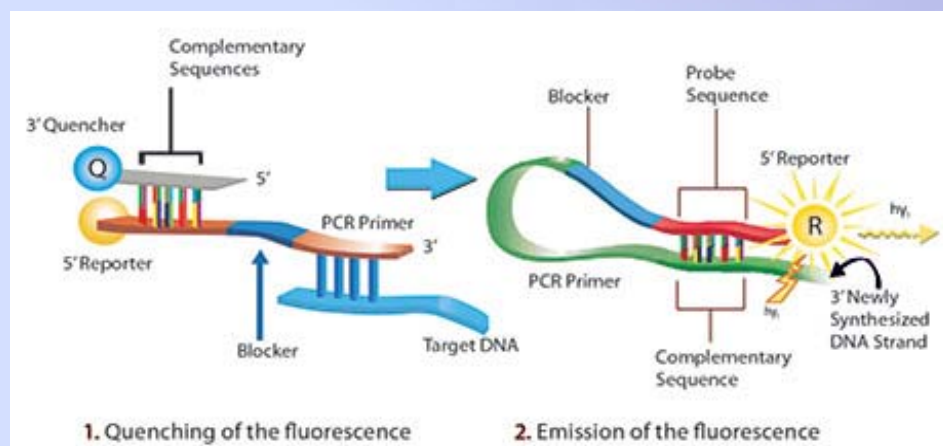
# MOLECULAR BEACONS (3)

DURANTE LO STEP DI ANNEALING, LA SONDA  
IBRIDIZZA ALLA SUA SEQUENZA TARGET:

CIO' SEPARA IL QUENCHER DAL REPORTER CON  
PRODUZIONE DI SEGNALE FLUORESCENTE



# SONDE SCORPIONS (4)



LA SCORPIONS BI- PROBE E' UN DUPLEX. UN FILAMENTO POSSIEDE ALL'ESTREMITA' 5' IL FLUOROFORO REPORTER E ALL'ESTREMITA' 3' UN PRIMER LEGATO TRAMITE UN "BLOCKER". L'ALTRO FILAMENTO POSSIEDE IL FLUOROFORO QUENCHER

1. ALL'INIZIO DELLA REAZIONE PCR, LA POLIMERASI SINTETIZZA IL FILAMENTO COMPLEMENTARE ALLA SEQUENZA TARGET .
2. DURANTE IL CICLO SUCCESSIVO, IL FILAMENTO CHE POSSIEDE IL QUENCHER SI DISSOCIA
3. IL FILAMENTO CHE POSSIEDE IL FLUOROFORO REPORTER IBRIDIZZA INTRAMOLECOLARMENTE ALLA SEQUENZA TARGET DI NEOSINTESI
4. POICHE' IL REPORTER NON E' PIU' VICINO AL QUENCHER SI HA EMISSIONE DI FLUORESCENZA

# PCR: criticità

La sensibilità della tecnica PCR può rappresentare paradossalmente un “problema”.

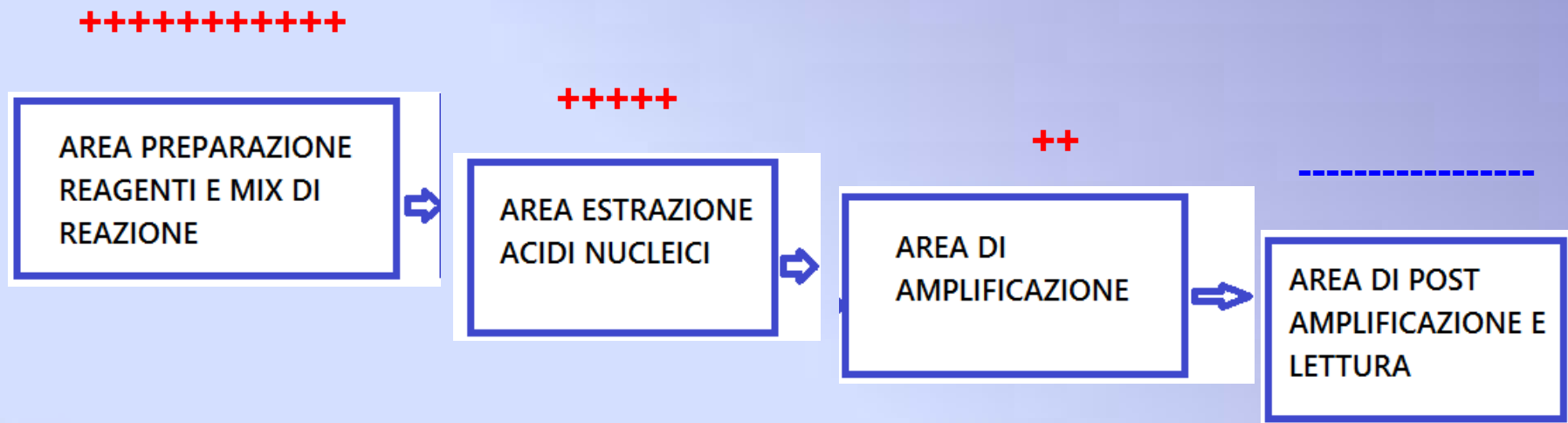
**CONTAMINAZIONE DA CARRY OVER:** DNA proveniente da precedenti amplificazioni, disperso nell’ambiente di allestimento della reazione, sull’operatore e sugli strumenti;

**CROSS - CONTAMINAZIONE:** può verificarsi durante la preparazione dei campioni o durante l’allestimento della reazione. Un campione positivo contamina un campione negativo generando un falso positivo.

**PRESENZA DI DNA ESOGENO:** Ad esempio DNA dell’operatore (in caso vengano amplificate regioni del genoma umano)

# Come risolvere le criticità?

## Pianificazione del laboratorio di Biologia Molecolare



Flusso di lavoro corretto

Flusso di lavoro errato !!!!!

# Separazione funzionale in aree

- AREE DI LAVORO IN AMBIENTI SEPARATI:  
RIDURRE LA CONTAMINAZIONE da “**CARRY-OVER**”
- D.P.I, STRUMENTI E ATTREZZATURE DEDICATE IN OGNI AREA ;
  - Conservazione di campioni , reagenti e acidi nucleici estratti in frigoriferi e congelatori distinti;
  - **CROSS-CONTAMINAZIONE**: Cambio frequente dei guanti DA CAMPIONE A CAMPIONE
  - Suddivisione dei reagenti in aliquote;
  - Attenzione nell'apertura delle provette (utilizzo di provette con tappo a vite, short spin per evitare aerosol in fase di apertura);
  - Utilizzo di pipette dedicate dotate di puntali con filtro, tarate.
- PULIZIA REGOLARE E FREQUENTE DELLE AREE DI LAVORO e applicazione del piano di manutenzione ambientale e strumentale con utilizzo di sostanze inattivanti gli acidi nucleici.

# USO DI CONTROLLI

## Controlli (-)

**CONTROLLO NEGATIVO DI PROCESSO:** Campione simile a quello sottoposto ad analisi ma privo della sequenza target. IL RISULTATO NEGATIVO FORNISCE EVIDENZA DELLA SPECIFICITA' DI REAZIONE.

**NO TEMPLATE CONTROL (NTC ):** CAMPIONE COSTITUITO DAI SOLI REAGENTI E ACQUA PER PCR. IL RISULTATO NEGATIVO FORNISCE EVIDENZA DELLA NON CONTAMINAZIONE DEI REAGENTI

# Controlli (+)

## **IPC (CONTROLLO DI PROCESSO):**

SERVE PER VALUTARE L'INTERO PROCESSO DALL'ESTRAZIONE DEL DNA AL RISULTATO FINALE.

**CONTROLLO POSITIVO:** Campione contenente la sequenza target.  
FORNISCE EVIDENZA DELLA CORRETTA ESECUZIONE DEL TEST PCR  
IN TUTTE LE SUE FASI.

**IAC (CONTROLLO INTERNO DI AMPLIFICAZIONE):** se lo IAC è amplificato in egual misura sia in assenza che in presenza di template non sono presenti nel campione sostanze inibenti l'amplificazione. L'eventuale negatività del campione non è dovuta ad inibizione.

# LTV - TEAM



*Paola*



*Sarah*



*Bianca*



*Laura*



*Francesco*

# THAT'S ALL FOLKS !!!