

VALUTAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ MICROBICA MEDIANTE L'UTILIZZO DI TECNICHE MOLECOLARI

Laboratorio di Genetica dei Microrganismi (Responsabile attività: Prof. Giovanni Salzano; Tutor: Dr.ssa Maria Grazia Bonomo)

L'obiettivo dell'attività di ricerca è quello di far acquisire allo studente conoscenze microbiologiche e molecolari mediante la partecipazione attiva all'attività di laboratorio, di fornire allo studente conoscenze pratiche relative alla purificazione del DNA genomico da colture pure, all'analisi del DNA estratto mediante l'ARDRA-PCR, amplificazione del gene 16S rDNA e successiva analisi di restrizione dei prodotti di amplificazione.

Queste analisi permettono allo studente di identificare i ceppi batterici mediante una metodologia semplice, precisa e rapida capace di differenziare i ceppi a livello della specie, con il confronto dei pattern ottenuti con quelli dei ceppi tipo utilizzati come riferimento.

Lo studente, al termine dell'attività di stage, avrà in suo possesso la capacità di agire praticamente nel lavoro di laboratorio con una relativa autonomia, e inoltre, molto importante, la capacità di leggere ed applicare in maniera critica i protocolli di lavoro.

Nello specifico l'attività riguarda:

- preparazione di substrati e tamponi necessari per le analisi
- estrazione DNA genomico da colture pure di ceppi di batteri lattici
- gel di agarosio e corsa elettroforetica per controllo estrazione
- amplificazione del gene ribosomiale 16S del DNA estratto e corsa elettroforetica su gel di agarosio
- analisi di restrizione del 16S rDNA amplificato mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione e corsa elettroforetica su gel di agarosio
- i pattern di bande ottenuti in seguito alla corsa elettroforetica su gel di agarosio sono visualizzati su transilluminatore a raggi UV e le immagini catturate con l'apparato GelDoc2000
- analisi dei pattern di restrizione mediante il programma Diversity Database software, confrontando i pattern dei ceppi da identificare con quelli dei ceppi tipo usati come riferimento al fine di ottenere la specie di appartenenza dei ceppi analizzati e una serie di

informazioni relative alle bande ottenute per ciascun ceppo, come peso molecolare, paio di basi, etc., così da poter osservare quelle che sono le caratteristiche specifiche per ciascun ceppo a livello molecolare.

➤ **PREPARAZIONE DI REAGENTI E TAMPONI NECESSARI PER LE ANALISI**

- ET (50 mM Tris – 5 mM EDTA pH 8)
- Lisozima (soluzione madre 50 mg/ml)
- Sodio dodecil fosfato (SDS) al 25%
- Pronase E (soluzione madre 20 mg/ml)
- Sodio perclorato alla concentrazione di 5 M
- Cloroformio-Alcool isoamilico (24:1)
- TE (10 mM Tris – 1 mM EDTA pH 8)

➤ **ESTRAZIONE DNA GENOMICO DA COLTURE PURE DI CEPPI DI BATTERI LATTICI**

- Prelevare 2 ml di brodocoltura e centrifugare a max rpm per 10 min;
- Eliminato il sovrinatante, risospendere per due volte il pellet in 1.5 ml di ET (50 mM Tris-5 mM

EDTA, pH 8.00);

- Centrifugare a max rpm per 5 min a temperatura ambiente;
- Eliminato il sovratanante, risospendere il pellet in 500 µl di ET;
- Aggiungere 70-100 µl di lisozima (soluzione madre 50 mg/ml) in modo da raggiungere una concentrazione in soluzione di 7 mg/ml, concentrazione adatta a lisare cellule di Enterococchi, Lattococchi, *Streptococcus thermophilus* e *Staphylococcus xylosus*; per Leuconostoc e Lattobacilli conviene aumentare la quantità fino 10 mg/ml;
- Incubare il campione in un bagnetto a 37°C per 30 min, agitando occasionalmente;
- Aggiungere 40 µl di SDS al 25% (Sodio-dodecil-solfato) e 3 µl di Pronase E (sol. madre 20 mg/ml).
- Invertire l'eppendorf 3-4 volte, molto dolcemente, fino a notare un illimpidimento del campione ed un aumento della viscosità
- Incubare a 37°C per 30 min;
- Raffreddare i campioni a temperatura ambiente per 10 min;
- Aggiungere 120 µl di Sodio perclorato 5 M (concentrazione finale: 1M);
- Aggiungere 1 volume (rispetto al campione) di Cloroformio-Alcool isoamilico (24:1);
- Agitare, invertendo l'eppendorf vigorosamente, per 5 min; Centrifugare al max rpm per 10 min a temperatura ambiente;
- Dopo aver centrifugato si formeranno 3 strati: uno inferiore contenente Cloroformio, uno centrale, sottile come una pellicola contenente impurità ed un terzo strato superiore contenente il DNA e l'RNA in soluzione;
- Recuperare con una micropipetta da 200 µl lo strato superiore, facendo molta attenzione a non risucchiare anche le impurità sottostanti;
- Riporre il sovratanante in una nuova eppendorf ed aggiungere 1 vol di Cloroformio- alcool isoamilico (24:1);
- Agitare, invertendo l'eppendorf vigorosamente, per 5 min;

- Centrifugare al max rpm per 10 min a temperatura ambiente;
- Recuperare il sovrantante, trasferirlo in una nuova eppendorf ed aggiungere molto lentamente 2 volumi (rispetto al recuperato) di alcool etilico (96%) a -20°C;
- Agitare, invertendo l'eppendorf, per 10 volte;
- Lasciare il campione per 30 min a -20°C;
- Centrifugare a max rpm per 20 min;
- Eliminare il sovrantante e lasciare asciugare il pellet fino a quando diventa traslucido;
- Aggiungere 50 µl TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.00) e disciogliere il pellet per almeno 1 h in ghiaccio a 4°C;
- Conservare il campione a -20°C.

➤ **GEL DI AGAROSIO E CORSA ELETTROFORETICA PER CONTROLLO ESTRAZIONE**

- Preparazione di un gel di agarosio all'1% in Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X
- Preparazione campione da caricare nel gel: 5 µl di DNA estratto + 5 µl acqua distillata + 1.67 µl di loading buffer

➤ **APPLICAZIONE DELLA TECNICA ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) - PCR**

Amplificazione del gene ribosomiale 16S del DNA estratto e corsa elettroforetica su gel di agarosio

- Preparazione miscela di reazione per la ARDRA - PCR

Primers: fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')

- Programma di amplificazione: 95 °C 3'

94 °C 1'

| Componenti | Soluzione stock | Concentrazione in reazione | Quantità in reazione |
|-------------------|-----------------|----------------------------|----------------------|
| DNA | | | 1 µl |
| BUFFER | 10X | 1X | |
| MgCl ₂ | 50 mM | 2.5 mM | |
| Mix dNTP | 25 mM each | 250 µM each | |
| PRIMER 1 | 0.1 mM | 0.2 µM | |
| PRIMER 2 | 0.1 mM | 0.2 µM | |
| TAQ POLIMERASI | 5U/ µl | 2.5U/50 µl | |
| ACQUA DD | | | |
| | | | |
| VOLUME TOTALE | | | 50 µl |

54 °C 45''

30 CICLI

72 °C 2'

—

72 °C 7'

- Preparazione di un gel di agarosio all'1.5% in Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X
- Preparazione campione da caricare nel gel: 5 μ l di DNA 16S ampl. + 5 μ l acqua distillata + 1.67 μ l di loading buffer

Analisi di restrizione del 16S rDNA amplificato mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione e corsa elettroforetica su gel di agarosio

- Preparazione miscela per l'analisi di restrizione:

| | |
|--------------------|-------|
| DNA (16S ampl.) | 10 ul |
| Enzima di restriz. | 1 ul |
| Buffer enzima | 2 ul |
| Acqua dd | 7 ul |
| | ----- |
| | 20 ul |

- Preparazione di un gel di agarosio al 2% in Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X
- Preparazione campione da caricare nel gel: 20 μ l di miscela restrizione + 3.34 μ l di loading buffer

➤ I PATTERN DI BANDE OTTENUTI IN SEGUITO ALLA CORSA ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO SONO VISUALIZZATI SU TRANSILLUMINATORE A RAGGI UV E LE IMMAGINI CATTURATE CON L'APPARATO GELDOC2000

- **ANALISI DEI PATTERN DI RESTRIZIONE MEDIANTE IL PROGRAMMA DIVERSITY DATABASE SOFTWARE, CONFRONTANDO I PATTERN DEI CEPPI DA IDENTIFICARE CON QUELLI DEI CEPPI TIPO USATI COME RIFERIMENTO AL FINE DI OTTENERE LA SPECIE DI APPARTENENZA DEI CEPPI ANALIZZATI E UNA SERIE DI INFORMAZIONI RELATIVE ALLE BANDE OTTENUTE PER CIASCUN CEPPO, COME PESO MOLECOLARE, PAIA DI BASI, ETC., COSÌ DA POTER OSSERVARE QUELLE CHE SONO LE CARATTERISTICHE SPECIFICHE PER CIASCUN CEPPO A LIVELLO MOLECOLARE.**