



Laboratorio di Microbiologia
Referente: Prof. Carla Vignaroli



I nostri inquilini invisibili

Viviamo quotidianamente in compagnia di una moltitudine invisibile di microrganismi, che si trova nell'ambiente circostante ma anche sulla superficie stessa del nostro corpo. I microrganismi sono onnipresenti, indispensabili e sempre più utilizzati nelle svariate attività umane e solo talvolta pericolosi: l'importante è saperli riconoscere!!

Lo scopo dell'attività è quello isolare una specie non patogena (*Staphylococcus epidermidis*) presente sulla cute e identificare il microrganismo mediante una tecnica molecolare, la tecnica della Polymerase Chain Reaction (o PCR) che permette di individuare un frammento di DNA specie-specifico, dopo amplificazione.

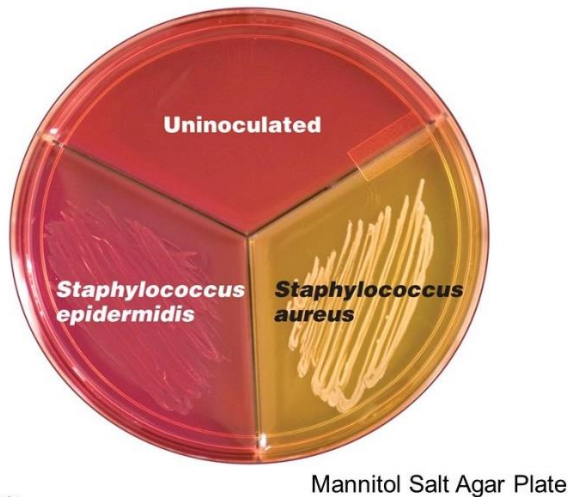
L'attività si svolge in due giornate:

Prima giornata (a scuola):

- eseguire tamponi cutanei (palmo della mano, viso, padiglione auricolare, cuoio capelluto...) su studenti volontari quindi seminare su piastre di terreno nutriente agarizzato (Brain Heart Infusion) e su terreno selettivo per stafilococchi (Mannitol Salt agar).
- Incubare le piastre a 37°C per 24 ore.

Seconda giornata (UNIVPM)

- Osservare le colonie cresciute e individuare presunti stafilococchi, ponendo attenzione alla morfologia e all'aspetto della colonia su terreno nutriente e su terreno selettivo.



Estrazione di DNA batterico

- Prelevare con l'ansa la colonia e inocularla in 200 microlitri di acqua distillata sterile in provetta eppendorf da 1,5 ml
- la sospensione (non deve essere molto torbida) viene passata al vortex fino a che la sospensione non è omogenea
- Incubare le provette con la sospensione 7-8 minuti in acqua in ebollizione
- Porre la sospensione (lisato batterico) immediatamente in ghiaccio

PCR specie specifica per l'identificazione di *S. epidermidis*

-Allestire la mix di PCR utilizzando i seguenti campioni:

- 1. estratto di DNA da lisato batterico di una colonia sospetta, isolata dal tampone cutaneo**
2. estratto di DNA di un ceppo di riferimento di *S. epidermidis* (**controllo positivo**)
3. estratto di DNA di un ceppo di riferimento di *S. aureus* (**controllo negativo**)
4. acqua da aggiungere al Mix di reazione al posto del DNA (**controllo negativo di reazione**)

Preparare la mix di reazione seguendo il seguente schema per ogni campione, considerando 20 µl come volume finale di reazione:



Reagenti (Conc. Iniziale)	Volume (concentrazione finale)
H ₂ O distillata sterile	6,6 µl
PCR Reaction Mix* (2x)	10 µl (1x)
Primer 705-1 (100 µM)	0.2 µl (0.8µM)
Primer 705-2 (100 µM)	0.2 µl (0.8µM)
Volume reazione	17 µl
estratto di DNA	3 µl
Volume totale	20 µl

*PCR reaction mix contiene: Taq-polimerasi, deossinucleotidi (ATP, GTP, CTP, TTP), tampone di reazione e MgCl₂

Avviare il termociclatore con il seguente programma di amplificazione:

95°C x 3 min
94°C x 30 sec
55°C x 30 sec 30 cicli
72°C x 30 sec
72°C x 7 min

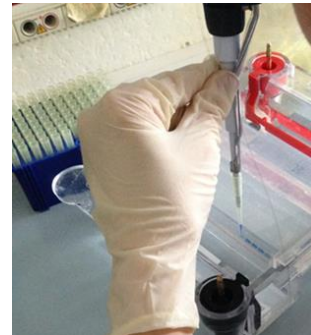
Elettroforesi

Preparare il gel di agarosio 1% utilizzando agarosio, buffer TAE (Tris- acetato- EDTA) e intercalante di DNA (RedGel).

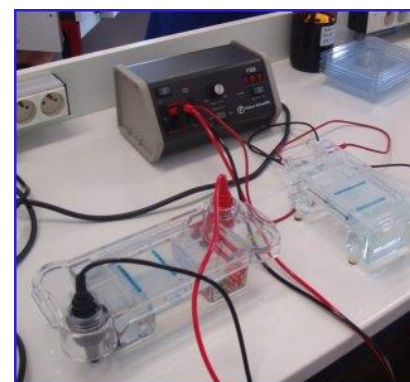
- Pesare 0,5 g di agarosio
- Aggiungere l'agarosio a 50 ml di tampone di corsa TAE 1X in un becker

Reagente	
Agarosio	0,5 g
TAE (1X)	50 ml
RedGel (10.000 X)	5 μ l

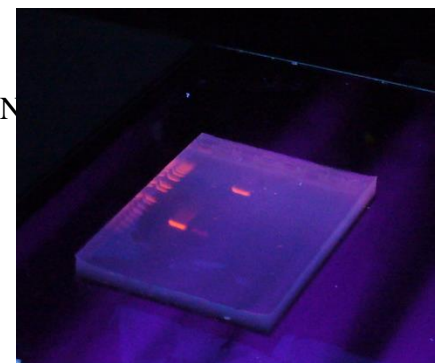
- Solubilizzare (fino ad ebollizione) su piastra riscaldante con agitatore
- Lasciare raffreddare a 50°C circa e aggiungere 5 μ l di RedGel
- Versare nel vassoio da elettroforesi con il pettine da 15 pozzetti
- Lasciare solidificare
- Caricare 10 μ l di ogni campione nei pozzetti del gel
- Caricare 4 μ l di marker di DNA costituito da frammenti di peso noto



- Collegare la camera elettroforetica all'alimentatore, e impostare un voltaggio di 80 V. La corsa può essere monitorata grazie al colorante presente nel campione che rende visibile il fronte di migrazione



- Al termine della corsa il gel viene posizionato su un transilluminatore che permette la visualizzazione dei frammenti di DNA (prodotti di PCR) come bande fluorescenti, grazie al red gel che si intercala al DNA. Il gel viene quindi fotografato e analizzato.





RISULTATO ATTESO

I campioni positivi, saranno quelli che in seguito alla PCR daranno un amplificato di DNA di 124 paia di basi (bp). Solo i campioni che contengono l'estratto di DNA di batteri appartenenti alla specie *S. epidermidis* saranno positivi

Gene specie-specifico	Amplificato atteso (bp)
705 fragment	124