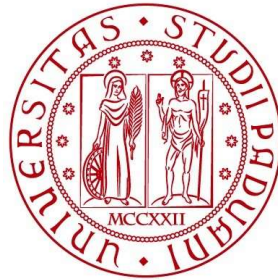


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Validazione di un metodo di Real Time PCR  
per la caratterizzazione quantitativa di  
popolazioni microbiche in una comunità  
sintrofica**

**Tutor:** Dott.ssa Laura Treu

Dipartimento di Biologia

**Laureanda:** Chiara Mafficini

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



# Indice

<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introduzione</b> .....	5
1.1 Comunità microbiche e simbiosi.....	5
<b>1.2 Real Time PCR: una tecnica vantaggiosa per la caratterizzazione di comunità microbiche complesse</b> .....	5
1.2.1 Basi teoriche della tecnica .....	6
1.2.2 Utilizzo della Real Time PCR nello studio di comunità microbiche .....	6
<b>1.3 Obiettivo del lavoro di tesi</b> .....	7
<b>2. Materiali e metodi</b> .....	8
2.1 Disegno dei primers e reazione di PCR .....	8
<b>2.2 Purificazione e controllo degli ampliconi</b> .....	9
<b>2.3 Quantificazione del DNA e preparazione delle soluzioni</b> .....	10
<b>2.4 Real Time PCR</b> .....	11
2.4.1 Allestimento della reazione .....	11
<b>3. Risultati e discussione</b> .....	13
3.1 Analisi dell'efficienza.....	13
3.2 Confronto del metodo classico con il metodo OPC.....	14
<b>4. Conclusioni</b> .....	18
<b>Bibliografia</b> .....	19
<b>Appendice</b> .....	20



# Abstract

Una comunità sintrofica è un tipo di comunità biologica in cui due o più organismi diversi si associano in modo mutualistico per trarre beneficio reciproco; la sinergia tra questi organismi si basa sullo scambio di sostanze nutritive o prodotti metabolici. La comunità presa in esame comprende batteri sintrofici ossidanti l'acetato (SAOB) e metanogeni idrogenotrofi, responsabili della produzione di metano da anidride carbonica e idrogeno.

Poiché i metodi di metagenomica standard utilizzati per lo studio di comunità hanno dei limiti, si è cercato di validare un metodo innovativo di analisi per la stima delle quantità delle singole specie. Si è deciso di utilizzare la Real Time PCR, una tecnica utilizzata in biologia molecolare per la determinazione del DNA presente in un campione. Il metodo introduce l'utilizzo dell'efficienza della reazione di amplificazione come fattore correttivo per la quantificazione del numero di copie di DNA, calcolate attraverso le rette di taratura. Tre tipi di batteri differenti, di cui è disponibile il DNA genomico purificato, sono stati scelti come modelli per la costruzione delle diverse rette; per ogni campione è stato poi confrontato il numero di copie calcolato utilizzando il fattore di correzione con il numero di copie calcolato con il metodo classico.



# 1. Introduzione

## 1.1 Comunità microbiche e sintrofia

I microrganismi sono ubiquitari nella biosfera del nostro Pianeta, ma a causa proprio di questa caratteristica è inevitabile come essi debbano vivere in comunità attraverso diverse interazioni, di cui la più comune è il mutualismo, in cui due o più specie differenti che vivono in stretta vicinanza dipendono l'una dall'altra per nutrimento o per la protezione dall'ambiente esterno. In particolare, la sintrofia è un'interazione interspecie in cui tutti i partner coinvolti traggono vantaggio, e si verifica quando i metaboliti prodotti da alcuni microrganismi diventano substrati metabolici di altri; questa fitta rete di scambio rende la crescita di un microrganismo all'interno di una comunità dipendente dalla presenza di altri (Kouzuma et al., 2015).

La comunità analizzata proviene da un bioreattore sperimentale per l'upgrading del biogas: all'interno di questa, l'archea *Methanothermobacter wolfeii* è preponderante rispetto agli altri microrganismi, poiché può rappresentare fino all'80% della comunità stessa. Questa specie è responsabile della metanogenesi idrogenotrofica, in cui il carbonio dell'anidride carbonica viene ridotto per formare metano (da qui il nome al processo). Nelle comunità della digestione anaerobica, un'interazione sintrofica si verifica tra questo microrganismo e specifici batteri, detti *Syntrophic Acetate Oxidizing Bacteria* (SAOB): essi svolgono l'ossidazione dell'acetato, con produzione di idrogeno e anidride carbonica, utile proprio al metabolismo dei metanogeni, instaurando una relazione sintrofica (Lyu et al., 2018).

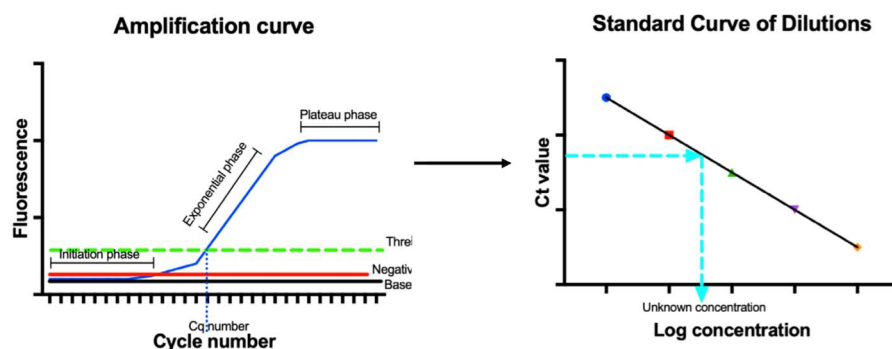
## 1.2 Real Time PCR: una tecnica vantaggiosa per la caratterizzazione di comunità microbiche complesse

Lo studio delle diverse comunità microbiche in termini di quantità e di tipologia di specie presenti è molto complesso, e può essere svolto attraverso i classici metodi microbiologici di isolamento, che permettono la caratterizzazione biochimica dei diversi microrganismi presenti oppure attraverso le nuove tecniche di metagenomica. Al contrario, l'isolamento in laboratorio di singoli microrganismi a partire da comunità sintrofiche non è possibile, poiché la maggior parte delle specie presenti sono ad oggi ancora poco definite dal punto di vista metabolico e interdipendenti l'una dall'altra, rendendo impossibile la loro crescita isolata e selettiva. Per questo motivo le tecniche di biologia molecolare sono largamente utilizzate nello studio di queste comunità complesse, e possono quindi contribuire in modo notevole alla loro caratterizzazione; in particolare, la Real Time PCR è molto utile per comprendere al meglio le quantità relative ed assolute di ogni singolo microrganismo presente, potenzialmente a compensazione dei limiti delle tecniche di sequenziamento next generation.

### 1.2.1 Basi teoriche della tecnica

La Real Time PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette la quantificazione del DNA presente all'interno di un campione. È una normale reazione di PCR a cui viene aggiunto in soluzione un fluoroforo specifico, che si lega prevalentemente al prodotto di PCR in doppia elica; la fluorescenza emessa dalla soluzione, dopo un'eccitazione ad un'opportuna lunghezza d'onda, viene utilizzata per la misura della quantità di amplicone presente, (solitamente viene misurata durante la fase di annealing o di estensione). La fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di amplicone, ma non viene rilevata sin dal primo ciclo di reazione, poiché la quantità di prodotto è ancora molto bassa; il numero del ciclo in cui l'intensità della fluorescenza supera uno specifico valore è chiamato ciclo soglia ( $C_t$ ), e dipende dalla concentrazione iniziale di template presente in soluzione (Adams, 2020).

La quantificazione assoluta può essere svolta attraverso la costruzione di una retta di taratura, che mette in relazione i diversi valori di  $C_t$  ottenuti da diluizioni seriali di uno standard con numero di copie note. Il  $C_t$  misurato sul campione viene inserito nell'equazione della retta di taratura, ottenendo una stima del numero di copie presenti.



**Figura 1:** a sinistra, un esempio di una classica curva di amplificazione. A destra, una retta di taratura costruita tramite il valore di ciclo soglia in funzione del logaritmo della concentrazione iniziale di template (Adams, 2020).

### 1.2.2 Utilizzo della Real Time PCR nello studio di comunità microbiche

Il metodo delle rette di taratura viene sfruttato per la quantificazione di un microorganismo presente all'interno di una comunità complessa. Il metodo più accurato prevede l'utilizzo di rette di taratura costruite a partire da uno standard, avente numero di copie noto di DNA genomico dei microrganismi che si vuole quantificare: può essere per questo motivo applicato dal momento in cui è disponibile il DNA genomico estratto e purificato. L'estrazione di DNA da singola specie richiede però un precedente isolamento in coltura pura, che, come detto in precedenza, è molto complicato per microrganismi derivanti da comunità sintrofiche, e quindi non è sempre applicabile.



Benché sia un metodo meno accurato, si può procedere con la costruzione delle rette di taratura partendo da ampliconi generati dal genoma dei microrganismi di interesse. A seguito dell'estrazione del DNA genomico totale di una comunità, comprendente quindi il DNA di tutti i microrganismi presenti, è possibile generare ampliconi da un singolo microrganismo utilizzando primers disegnati appositamente per la specie. Gli ampliconi purificati vengono poi usati per costruire la retta di taratura in sostituzione al DNA genomico, permettendo di quantificare il numero di copie del rispettivo genoma nel campione di comunità.

Un possibile problema derivante dall'utilizzo di questo metodo è dato dalla differenza di efficienza delle reazioni di amplificazione (Brankatschk et al., 2012). Nello specifico differenze tra l'efficienza di amplificazione tra standard e campione possono portare ad errori nella stima delle quantità; l'efficienza si riferisce alla capacità della reazione di Real Time PCR di duplicare il DNA target durante ogni ciclo (Taylor et al., 2019). È specifica per ogni reazione di amplificazione, poiché dipende sia dai *primers* che dalle condizioni specifiche: per questo motivo, due reazioni con efficienza differente non possono essere direttamente confrontate. Il problema viene rivolto al calcolo del numero di copie di DNA incognite attraverso la retta di taratura costruita con gli ampliconi. Il metodo *One-Point Calibration* (OPC) è una tecnica alternativa per la quantificazione assoluta di microrganismi, che propone la sostituzione dell'utilizzo delle rette di taratura con l'utilizzo di un unico punto per la quantificazione del numero di copie di DNA. Questa tecnica prende in considerazione il problema dell'efficienza nella stima di queste e, in particolare, propone di correggere il valore calcolato in base alla differente efficienza di amplificazione ottenuta sullo standard e il campione (Brankatschk et al., 2012).

### 1.3 Obiettivo del lavoro di tesi

L'obiettivo del lavoro è la verifica dell'efficacia del metodo OPC nella stima di quantificazioni assolute di microrganismi a partire da una comunità. La strategia utilizzata è stata basata sulla costruzione di rette di taratura diverse, ottenute dal calcolo dei cicli soglia in funzione di diluizioni scalari del template. Si è scelto di utilizzare tre microrganismi differenti come modelli per il calcolo di queste rette, tra cui i batteri *Escherichia coli* e *Cupriavidus necator*, e l'archea *Methanothermobacter wolfeii*. È stato calcolato il numero di copie di DNA attraverso le rette di taratura costruite sugli ampliconi (metodo classico), per confrontarle con il valore calcolato utilizzando il metodo OPC; la retta di taratura derivante dal DNA genomico, essendo più accurata, è stata invece sfruttata come controllo. Dopo la progettazione di primers specie specifici, sono stati generati 3 set differenti di ampliconi tramite PCR. Si è quindi proceduto con l'allestimento della reazione di Real time PCR, grazie alla quale sono state costruite le rette di taratura degli ampliconi generati precedentemente. Oltre a queste, sono state generate altre rette da campioni di comunità sintetiche contenenti i tre diversi genomi per verificare la possibilità di utilizzare il metodo OPC anche su comunità. Se il metodo risulta valido sarà possibile implementarlo per stimare in modo accurato la quantità

assoluta di specifici microrganismi all'interno di comunità sintrofiche da cui non si può ottenere DNA genomico puro.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Disegno dei primers e reazione di PCR

I primers sono di fondamentale importanza per il successo di una reazione di PCR e per la relativa efficienza: i primers di *M. wolfeii* sono stati presi dalla letteratura, mentre i primers di *C. necator* e di *E. coli* sono stati disegnati tramite l'utilizzo di Primer-BLAST. Per *M. wolfeii* e *C. necator* sono stati scelti primers complementari a geni corrispondenti a regioni ipervariabili dell'rRNA 16S, in modo da avere in entrambi i casi un'elevata specificità di appaiamento. Per *E. coli* è stato scelto il gene *uidA* come sito di disegno del primer, in ragione del fatto che è molto conservato in questa specie.

Sono stati così generati dei primers di lunghezza ottimale (~20 bp), in modo da ottenere un'adeguata specificità verso la sequenza del template; il GC content è stato variato in modo da ottenere una temperatura di melting ( $T_m$ ) simile per tutti i primers (~60°C). Questa è molto importante in quanto tutti i primers verranno testati con la stessa temperatura di annealing durante la reazione.

Le coppie di primers sono state progettate in modo da ottenere degli ampliconi con lunghezza maggiore di 150 bp (**Tab.1**), così da poter eseguire la purificazione con *beads* magnetiche, non effettuabile con ampliconi di lunghezza minore.

**Tabella 1.** Lista dei primers utilizzati per la reazione di PCR e di Real Time PCR

Specificità	Primer	Sequenza	Lunghezza amplicone (bp)
<i>M. wolfeii</i>	410_F	CTCTTAACGGGGTGGCTTTT	230
	667_R	CCCTGGGAGTACCTCCAGC	
<i>C. necator</i>	nec_F	TTGGACAATGGGGGCAACCC	369
	nec_R	GCTGCCTTCGCCATCGGTAT	
<i>E. coli</i>	uidA_1385F	TGCTGTGCCTGAACCGTTAT	338
	uidA_1722R	GTCGCGAGTGAAGATCCCTT	

Gli ampliconi per la costruzione della retta di taratura sono stati generati tramite PCR: sono state eseguite molte prove per la valutazione della specificità dei primers e per la verifica dell'assenza di agenti contaminanti nelle varie soluzioni di preparazione della reazione. Per ogni reazione di PCR sono stati aggiunti controlli negativi verso campioni

di DNA non specifici per i primers di interesse e bianchi di reazione. Ogni singola reazione di PCR è stata preparata come riportato in **Tabella 2**.

**Tabella 2.** Allestimento di una singola reazione di PCR

	<b>Volume aggiunto (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Volume totale (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Mix Taq polimerasi 2X</b>	10.0	20.0
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8.2	
<b>Primer forward (10 <math>\mu</math>M)</b>	0.4	
<b>Primer reverse (10 <math>\mu</math>M)</b>	0.4	
<b>DNA genomico (10 ng/<math>\mu</math>L)</b>	1.0	

Sono stati in seguito utilizzati i seguenti parametri di reazione:

1. Denaturazione iniziale a 95°C x 5 minuti
2. Un totale di 35 cicli, divisi in:
  - 2.1 Denaturazione a 95°C x 15 secondi
  - 2.2 Annealing a 57°C x 15 secondi
  - 2.3 Estensione a 72°C x 30 secondi
3. Estensione finale a 72°C x 5 minuti

## 2.2 Purificazione e controllo degli ampliconi

Ottenuti gli ampliconi dalla reazione PCR, è molto importante procedere con una fase di purificazione, per eliminare dalla soluzione i primers rimanenti ed i reagenti della PCR che possono influire sull'amplificazione e la quantificazione del DNA. La purificazione è stata effettuata tramite il kit AMPure XP (Beckman Coulter). Il reagente contiene beads ricoperte di silice che formano interazioni elettrostatiche con gli acidi nucleici: essendo gli ampliconi di lunghezza maggiore rispetto ai primers, essi si legano con maggior forza alle beads, mentre quest'ultimi restano in soluzione.

Secondo la procedura di purificazione, sono stati incubati i vari campioni con un volume appropriato di beads magnetiche a temperatura ambiente, per un totale di 5 minuti all'interno di un rack magnetico, che permette la separazione delle beads dalla soluzione, che è stata eliminata in seguito. Sono stati poi eseguiti dei lavaggi ripetuti con una soluzione di etanolo all'80%, che permettono il rilascio di molecole cariche aspecifiche che possono aver interagito debolmente con le beads; al termine dei vari lavaggi, viene aggiunto un volume di acqua arbitrario per la risospensione degli ampliconi.

Per l'analisi qualitativa dei prodotti di PCR viene svolta un'elettroforesi in gel di agarosio al 2%. Viene utilizzato GeneRuler DNA ladder da 50 bp; come tampone di corsa viene

utilizzato il TAE, come intercalante del DNA viene invece utilizzato il bromuro di etidio. Vengono caricati sui vari pozzetti i campioni precedentemente purificati e i campioni non purificati, (i vari controlli negativi). Viene applicato un voltaggio di 120 V per un totale di 30 minuti.

## 2.3 Quantificazione del DNA e preparazione delle soluzioni

Verificato il successo della PCR e della purificazione, viene svolta un'analisi quantitativa degli ampliconi ottenuti tramite Qubit, uno spettrofotometro a fluorescenza che permette un'accurata quantificazione degli acidi nucleici. Viene utilizzato il fluoroforo HS (High Sensitivity), che permette la quantificazione del dsDNA anche a concentrazioni molto basse, con range di rilevamento da 0.1 ng a 120.0 ng.

Oltre agli ampliconi, viene quantificato allo stesso modo anche il DNA genomico disponibile dei tre microrganismi. Il numero di copie scelto per preparare le soluzioni nelle varie tipologie di campione è arbitrario, ma non casuale; viene così calcolato il numero di copie per  $\mu\text{L}$  grazie alla concentrazione di DNA ( $C_{\text{DNA}}$  [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]), alla lunghezza del frammento di DNA ( $l_{\text{DNA}}$  [bp]), al numero di Avogadro ( $N_A$ ) e alla massa molecolare media di una coppia di basi del DNA ( $M_{\text{bp}}$  [g/mol]), come da **Equazione 1**.

$$\text{Equazione 1.} \quad \text{copie}/\mu\text{L} = \frac{c_{\text{DNA}} \times N_A}{l_{\text{DNA}} \times M_{\text{bp}}}$$

Una comunità sintetica, "Mock I", viene preparata combinando un ugual numero di copie dei tre genomi, e simula una comunità in cui tutti i microrganismi sono presenti nelle stesse quantità. Un'altra comunità sintetica, "Mock II", viene preparata rispettando le proporzioni degli organismi della comunità presa in esame, in cui *M. wolfeii* ne rappresenta l'80%; il numero di copie introdotto per ogni microrganismo è stato calcolato per mantenere costante questo rapporto (8:1:1). Tutti i campioni vengono poi diluiti per la costruzione della retta di taratura, con diluizioni seriali 1:10 in acqua, con volume totale pari a 60  $\mu\text{L}$ . Gli ampliconi vengono diluiti fino ad un fattore di  $10^{-7}$ , mentre il DNA genomico e i due campioni Mock fino ad un fattore di  $10^{-3}$ : il numero rispettivo di copie iniziali e finali viene riportato in **Tabella 3**.

**Tabella 3.** Schema di diluizione dei vari campioni

	<b>Tipologia</b>	<b>n° di copie DNA nella soluzione madre</b>	<b>n° di copie DNA nella diluizione finale</b>
<b><i>M. wolfeii</i></b>	Ampliconi	400,000,000	40
	Genomico	4,000,000	4,000
	Mock I	4,000,000	4,000
	Mock II	19,200,000	19,200
<b><i>C. necator</i></b>	Ampliconi	400,000,000	40
	Genomico	4,000,000	4,000
	Mock I	4,000,000	4,000
	Mock II	2,400,000	2,400
<b><i>E. coli</i></b>	Ampliconi	400,000,000	40
	Genomico	4,000,000	4,000
	Mock I	4,000,000	4,000
	Mock II	2,400,000	2,400

## 2.4 Real Time PCR

### 2.4.1 Allestimento della reazione

La piastra è stata organizzata in modo da quantificare le quattro differenti tipologie di campioni, vale a dire gli ampliconi generati e purificati con le beads, il DNA genomico dei tre microrganismi e le due comunità sintetiche (Mock I e Mock II), generate dalla combinazione dei tre genomi.

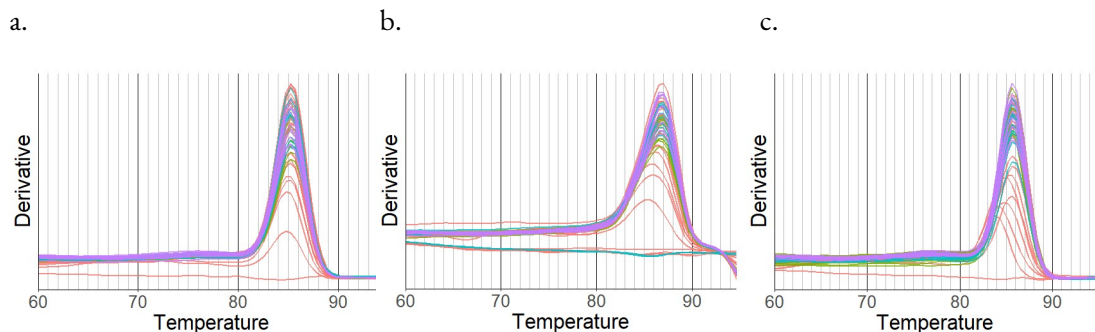
Per ogni pozzetto della piastra vengono aggiunti:

- Soluzione di DNA (ampliconi, genomico, Mock I o Mock II) 5  $\mu$ l
- PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) 5  $\mu$ l
- Primers (soluzione di reverse e forward), 30  $\mu$ M 0.2  $\mu$ l

Sono stati in seguito utilizzati i seguenti parametri di reazione:

1. Denaturazione iniziale a 95°C x 2 minuti
2. Denaturazione a 95°C x 15 secondi
3. Annealing, estensione e misura della fluorescenza 58°C x 1 minuto
4. Curva di melt 60-95°C

Ogni campione è stato caricato come triplicato nella piastra, in modo da ottenere risultati più solidi per l'analisi dei dati, mentre l'assenza di aspecifici è stata controllata tramite l'analisi della curva del melting point. È possibile che durante la reazione avvengano degli appaiamenti tra i diversi primers, generando così dei prodotti aspecifici che contribuiscono alla fluorescenza misurata. Poiché ogni prodotto generato è caratterizzato da una specifica temperatura di melting, l'assenza di questi aspecifici è determinata dalla presenza di un singolo picco nella curva del melting point (**Figura 2**).



**Figura 2.** Viene mostrata la curva del melting point di ogni campione, separatamente per set di primers. a. *E. coli*, b. *M. wolfeii*, c. *C. necator*.

#### 2.4.2 Retta di taratura, efficienza di reazione e applicazione del metodo OPC

La retta di taratura è costruita con una regressione lineare del ciclo soglia ( $C_t$ ) misurato ad ogni step della diluizione contro il logaritmo del numero di copie presenti, tramite software Microsoft Excel, ottenendo un'equazione esemplificata dall'**Equazione 2**, in cui  $N_0$  corrisponde al numero di copie di DNA, e  $C_t$  al ciclo soglia corrispondente. Vengono calcolate le rette di taratura dei vari campioni attraverso il valore  $C_t$  medio dei tre replicati in funzione del logaritmo del numero di copie di ogni diluizione ( $\log[N_0]$ ). Per l'applicazione del metodo OPC sono stati invece utilizzati punti della curva di taratura singoli e diversi: il valore di  $N_0$  standard usato è stato scelto per la sua vicinanza numerica con il numero di copie di DNA effettivamente introdotte nella preparazione delle soluzioni. L'efficienza di amplificazione ( $E$ ) viene calcolata attraverso una derivazione della pendenza della retta di taratura ( $b$ ), come in **Equazione 3**. L'efficienza assume valori da 0 a 1, (dove 1 indica una totale duplicazione del DNA ad ogni ciclo), ma una reazione di Real Time PCR viene considerata buona con un valore di efficienza maggiore di 0.80 (Taylor et al., 2019). Per calcolare il numero di copie in un campione utilizzando la retta di taratura costruita con lo standard, si utilizza l'equazione inversa **Equazione 4**.

Per la validazione del metodo OPC viene ricalcolato il numero di copie di ogni genoma ( $NO(sample)$ ), sia per la comunità Mock che per le diluizioni di DNA genomico, attraverso la retta di taratura del corrispondente amplicone ( $NO, E, Ct\ standard$ ), utilizzando il rapporto delle due efficienze come fattore di correzione (**Eq. 5**). È stato poi confrontato il valore ottenuto attraverso il metodo OPC con il numero di copie calcolato utilizzando le equazioni delle rette di taratura. Per il calcolo del fattore di correzione introdotto dal metodo OPC è stata utilizzata una formula alternativa dell'efficienza, come in **Equazione 6**, (Pfaffl, 2001).

**Equazione 2.**  $Ct = a + b \times \log(NO)$

**Equazione 3.**  $E = 10^{(-1/b)} - 1$

**Equazione 4.**  $NO = 10^{(Ct-a)/b}$

**Equazione 5.**  $NO(sample) = NO(standard) \times \frac{E^{Ct(standard)}}{E^{Ct(sample)}}$

**Equazione 6.**  $E = 10^{(-1/b)}$

## 3. Risultati e discussione

### 3.1 Analisi dell'efficienza

Viene innanzitutto calcolata l'efficienza relativa alle quattro reazioni di amplificazione per ogni coppia di *primers* e riportata in **Tabella 4**. Le efficienze dei tre campioni di ampliconi sono maggiori del valore soglia stabilito che indica l'affidabilità della reazione di amplificazione; al contrario, i valori di efficienza ottenuti per la maggior parte dei campioni *mock* e di DNA genomico sono minori. Il motivo principale di questa differenza riguarda la lunghezza del frammento che viene amplificato: si ipotizza come l'amplificazione di frammenti di lunghezza maggiore comporti un abbassamento dell'efficienza, a causa della presenza di sequenze con parziale complementarità lungo il frammento, che aumentano all'aumentare della lunghezza dello stesso. Queste sequenze instaurano delle interazioni deboli con i *primers* in soluzione, causandone il sequestro durante la fase di *annealing*.

La differenza di efficienza osservata dimostra come sia importante considerare questo parametro per una stima più corretta delle quantità microbiche. L'efficienza di amplificazione è infatti un criterio rilevante da considerare quando si vuole quantificare accuratamente il DNA target presente in un campione, poiché una buona efficienza è necessaria per ottenere risultati affidabili e riproducibili.

**Tabella 4.** Valori di efficienza calcolati per ogni reazione di amplificazione. Si ricorda la differenza tra i campioni mock I e mock II: nel primo rispettivamente la proporzionalità tra i tre genomi è 1:1:1, nel secondo è di 8:1:1.

	<b>Campione</b>	<b>Efficienza</b>
<i>E. coli</i>	Ampliconi	0.927
	DNA genomico	0.789
	Mock I	0.794
	Mock II	0.766
<i>C. necator</i>	Ampliconi	0.845
	DNA genomico	0.860
	Mock I	0.778
	Mock II	0.778
<i>M. wolfeii</i>	Ampliconi	0.870
	DNA genomico	0.751
	Mock I	0.797
	Mock II	0.830

### 3.2 Confronto del metodo classico con il metodo OPC

È stato innanzitutto calcolato il numero di copie dei campioni *mock* utilizzando le rette di taratura del DNA genomico, per verificare eventuali errori nella preparazione delle comunità sintetiche. Il calcolo viene svolto prima utilizzando il metodo classico e poi utilizzando il metodo OPC, con l'introduzione del fattore correttivo (**Eq. 5**). I risultati sono riportati in **Tabella 5**. Viene determinato l'errore di quantificazione attraverso il rapporto tra numero di copie calcolato e il numero di copie effettivamente aggiunto durante la preparazione delle soluzioni: un valore di 1 dunque indica una perfetta concordanza. Nonostante i valori di efficienza siano in alcuni casi minori di 0.80 (**Tab. 4**), si nota come i rapporti di errore calcolati attraverso il metodo classico siano tutti di



ordine 1. Questi valori indicano una buona preparazione dei campioni Mock, e come l'utilizzo delle rette di taratura con DNA genomico standard sia un metodo accurato per il calcolo del numero di copie di DNA di un campione incognito. In base alle linee guida, i valori di efficienza riscontrati suggerirebbero la necessità di ripetere le reazioni di amplificazione: tuttavia, il calcolo del numero di copie del campione Mock dalle rette di DNA genomico ha dimostrato una stima delle quantità molto valida. Le reazioni di Real Time PCR sono state quindi ritenute affidabili.

Si osserva poi come l'errore venga ridotto con l'introduzione del fattore correttivo proposto dal metodo OPC nei casi di *E. coli* e *M. wolfeii*, mentre aumenta notevolmente in *C. necator*. Questa discordanza può trovare spiegazione nella differenza di efficienza delle reazioni di amplificazione dei campioni Mock e del DNA genomico: quando questa risulta più ampia, l'errore viene aumentato. Nel caso di *C. necator*, la differenza di efficienza è quasi pari a 0.1 (Tab. 4), e il fattore correttivo, che dovrebbe correggere questa discrepanza, ne aumenta l'errore di quantificazione.

Poiché i risultati provano una corretta preparazione della soluzione Mock, è sensato aspettarsi dei risultati simili per quanto riguarda il calcolo del numero di copie dei campioni Mock attraverso la retta di taratura degli ampliconi. I risultati del campione Mock II, ottenuti attraverso il metodo classico, mantengono la proporzionalità iniziale del numero di copie introdotte, che viene però minimamente persa con l'utilizzo del metodo OPC (Tabella 8 in Appendice).

**Tabella 5.** Confronto tra i due metodi di calcolo per il calcolo di copie nel campione Mock I attraverso le equazioni delle rette di taratura del DNA genomico

	N <sub>0</sub> effettivo	N <sub>0</sub> calcolato	Errore	N <sub>0</sub> calcolato con OPC	Errore
<i>E. coli</i>	333,333	337,604	1.0	324,829	1.0
	33,333	43,495	1.3	39,856	1.2
	3,333	4,353	1.3	3,866	1.2
	333	349	1.0	329	1.0
<i>C. necator</i>	333,333	314,523	0.9	659,946	2.0
	33,333	32,748	1.0	91,478	2.7
	3,333	2,523	0.8	3,857	1.2
	333	129	0.4	627	1.9

<i>M. wolfeii</i>	333,333	427,338	1.3	317,161	1.0
	33,333	48,948	1.5	28,480	1.2
	3,333	5,639	1.7	3,028	1.2
	333	578	1.7	315	1.0

Il procedimento è stato ripetuto per il calcolo del numero di copie dei campioni Mock, svolto attraverso il metodo classico e il metodo OPC e utilizzando gli ampliconi come standard: in questo modo entrambi i metodi vengono testati con i campioni di comunità sintetica, così da verificare la possibilità dell'utilizzo di entrambi su comunità sintrofiche vere e proprie. I dati vengono riportati in **Tabella 6** per i campioni Mock I e in **Tabella 7** per i campioni Mock II. Il numero di copie calcolato per *M. wolfeii* è stato diviso per 2, in quanto il gene su cui sono stati disegnati i primers è duplicato nel genoma.

L'errore calcolato con il metodo classico è aumentato se confrontato con i valori riportati in **Tabella 5**; il numero di copie calcolato risulta sempre sovrastimato, e non vi è un trend specifico nell'andamento dell'errore. Premettendo che i campioni Mock sono stati precedentemente controllati e che l'efficienza delle reazioni di amplificazione degli ampliconi è in tutti e tre i casi molto alta (**Tab. 4**).

La proporzionalità tra i microrganismi in termini di copie di DNA nel campione Mock II viene persa con il calcolo di queste attraverso la retta di taratura degli ampliconi; si osserva inoltre come l'utilizzo del metodo OPC non porti ad un miglioramento della stima del numero di copie (**Tab. 6** e **Tab. 7**), ma al contrario aumenti notevolmente l'errore di quantificazione, che, come riferito precedentemente, può essere dovuto ad una differenza marcata nei valori di efficienza delle due reazioni di amplificazione (**Tab. 4**).

**Tabella 6.** Confronto tra i due metodi di calcolo per il calcolo di copie del campione Mock I attraverso le equazioni delle rette di taratura degli ampliconi

	<b>N<sub>0</sub> effettivo</b>	<b>N<sub>0</sub> calcolato</b>	<b>Errore</b>	<b>N<sub>0</sub> calcolato con OPC</b>	<b>Errore</b>
<i>E. coli</i>	333,333	809,583	2.4	5,772,680	17.3
	33,333	83,382	2.5	677,401	20.3
	3,333	6,489	1.9	84,494	25.3
	333	395	1.2	12,313	36.9

<i>C. necator</i>	333,333	2,536,099	7.6	4,937,036	14.8
	33,333	340,584	10.2	750,055	22.5
	3,333	35,008	10.5	105,481	31.6
	333	2,505	7.5	7,106	21.3
<i>M. wolfeii</i>	333,333	1,173,302	3.5	2,301,669	6.9
	33,333	96,834	2.9	198,031	5.9
	3,333	8,045	2.4	14,615	4.4
	333	584	1.8	2,044	6.1

**Tabella 7.** Confronto tra i due metodi di calcolo per il calcolo di copie del campione Mock II attraverso le equazioni delle rette di taratura degli ampliconi

	<b>N<sub>0</sub> effettivo</b>	<b>N<sub>0</sub> calcolato</b>	<b>Errore</b>	<b>N<sub>0</sub> calcolato con OPC</b>	<b>Errore</b>
<i>E. coli</i>	200,000	824,838	4.1	4,820,788	24.1
	20,000	85,522	4.3	94,468	4.7
	2,000	9,805	4.9	11,154	5.6
	200	572	2.9	962	4.8
<i>C. necator</i>	200,000	2,227,503	11.1	4,336,289	21.7
	20,000	214,110	10.7	564,424	28.2
	2,000	28,570	14.3	106,739	53.4
	200	2,015	10.1	7,305	36.5
<i>M. wolfeii</i>	1,600,000	3,220,638	2.0	4,502,326	2.8
	160,000	310,957	1.9	417,830	2.6

	16,000	31,917	2.0	35,013	2.2
	1,600	1,923	1.2	3,816	2.4

## 4. Conclusioni

La Real Time PCR è una tecnica che permette la quantificazione di DNA all'interno di un campione, attraverso la costruzione di rette di taratura a partire da standard con DNA genomico noto: questo metodo può essere applicato alla quantificazione di organismi presenti in una comunità sintrofica, attraverso l'utilizzo di ampliconi specifici generati dal DNA totale della comunità come standard per le rette di taratura. La stima delle quantità attraverso questo metodo è meno accurata rispetto a quella derivante dal metodo classico. Una possibile correzione della quantificazione è stata introdotta nel metodo OPC, che utilizza l'efficienza come fattore correttivo della stima; in questa tesi si è valutata l'affidabilità di questo metodo.

Il calcolo del numero di copie di DNA attraverso la retta di taratura costruita da DNA genomico ha confermato l'accuratezza di questo metodo. Dai dati ottenuti si riscontra un miglioramento della quantificazione con l'utilizzo del metodo OPC solamente nel caso in cui le due efficienze di reazione siano molto simili tra loro: efficienze buone ma comunque differenti determinano invece un peggioramento nell'accuratezza dell'analisi. Prendendo invece in considerazione la quantificazione svolta attraverso le rette di taratura degli ampliconi, sia l'utilizzo del metodo classico che l'utilizzo del metodo OPC ha comportato un errore elevato nella stima del numero di copie di DNA; si nota inoltre come il metodo OPC aumenti notevolmente questo errore in tutti i casi.

Alla luce di quanto è stato detto, si sottolinea innanzitutto come l'utilizzo di DNA genomico come standard per le curve di taratura sia una tecnica molto più precisa rispetto invece al metodo che utilizza gli ampliconi, e dovrebbe essere quindi preferito per lo studio di comunità (nei casi in cui è disponibile il DNA genomico puro).

Infine, il metodo OPC è considerato valido per migliorare la stima del numero di copie di DNA solo in specifici contesti in cui l'efficienza delle reazioni di amplificazione è estremamente simile. In altri casi, l'utilizzo del metodo porta ad una sovrastima del numero di copie di DNA. È importante notare come tale metodo, che mira a correggere la quantificazione basandosi proprio sulla diversità dei valori di efficienza, non è appropriato quando questa è presente.

## Bibliografia

Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Bürgmann, H. (2012). Simple Absolute Quantification Method Correcting for Quantitative PCR Efficiency Variations for Microbial Community Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 12(5), 78. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>

Kouzuma, A., Kato, S., & Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in microbiology*, 6, 477. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00477>

Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current biology*: CB, 28(13), R727–R732. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>

Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *Biochem (Lond)*, 42(3): 48–53. doi: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Taylor, S., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 7(6): 761-774. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>

## Appendice

**Tabella 8.** Confronto tra i due metodi di calcolo per il calcolo di copie nel campione Mock II attraverso le equazioni delle rette di taratura del DNA genomico

	<b>N<sub>0</sub> effettivo</b>	<b>N<sub>0</sub> calcolato</b>	<b>Errore</b>	<b>N<sub>0</sub> calcolato con OPC</b>	<b>Errore</b>
<i>E. coli</i>	200,000	214,777	1.1	271,266	1.4
	20,000	23,179	1.2	29,601	1.5
	2,000	2,761	1.4	3,625	1.8
	200	169	0.8	254	1.3
<i>C. necator</i>	200,000	271,745	1.4	579,643	2.9
	20,000	19,411	1.0	57,508	2.9
	2,000	2,006	1.0	3,147	1.6
	200	101	0.5	504	2.5
<i>M. wolfeii</i>	1,600,000	1,027,273	0.6	623,567	0.4
	160,000	134,845	0.8	60,458	0.4
	16,000	18,666	1.2	7,305	0.5
	1,600	1,627	1.0	593	0.4