



*Laboratorio virtuale:
identificazione di un ceppo
batterico mediante tecniche
biomolecolari*

<https://www.biointeractive.org/classroom-resources/bacterial-identification-virtual-lab>

9 aprile 2021

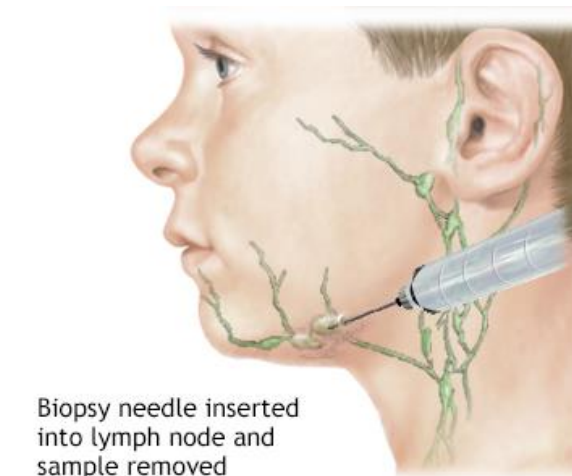
Relatrice:
Rocchina Miglionico

Campione A: aspirato linfonodale di un paziente che lamenta febbre, affaticamento e ingrossamento delle ghiandole linfatiche.

Campione B : feci di un paziente con una temperatura normale, che lamenta gravi crampi addominali e diarrea.

Campione C : urina di un paziente che lamenta dolore durante la minzione

Campione D: prelievo di sangue di un paziente che lamenta febbre, mal di testa, dolori articolari, costipazione, perdita di appetito e dolore addominale.



Terreno di coltura solido:
contiene tutti i nutrienti per la
crescita batterica

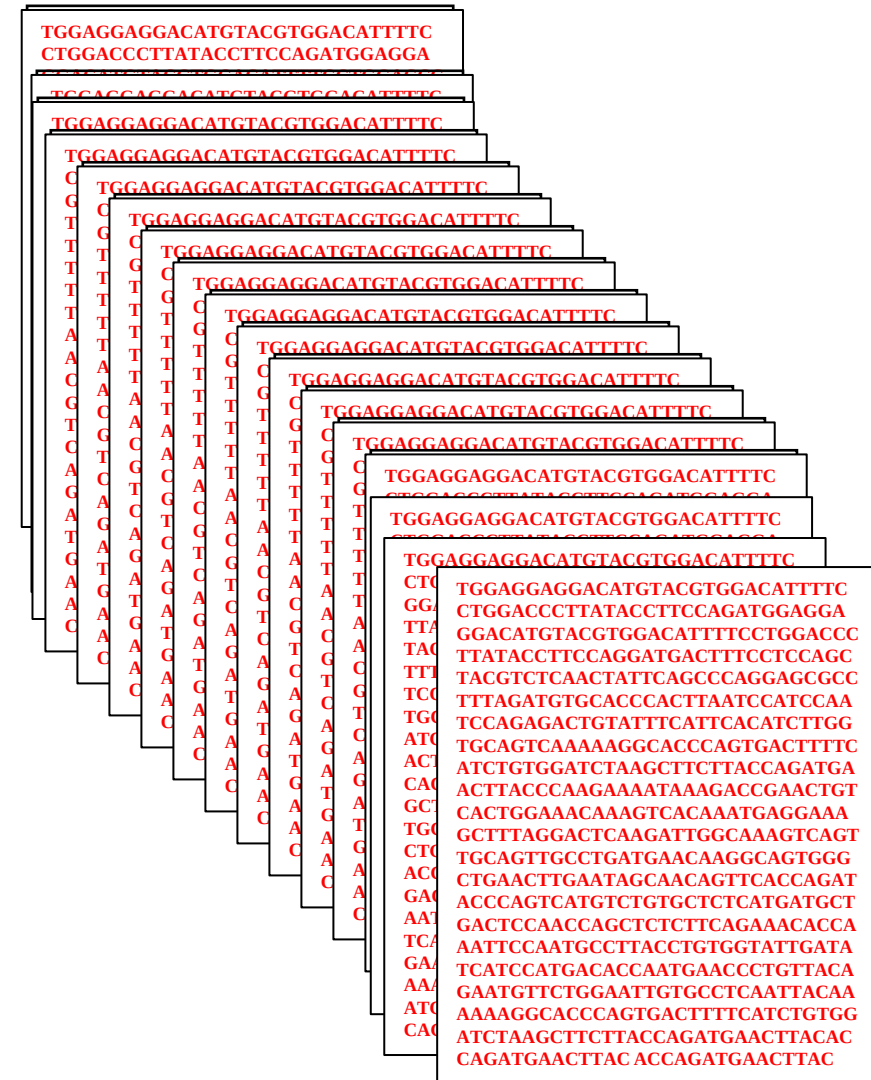
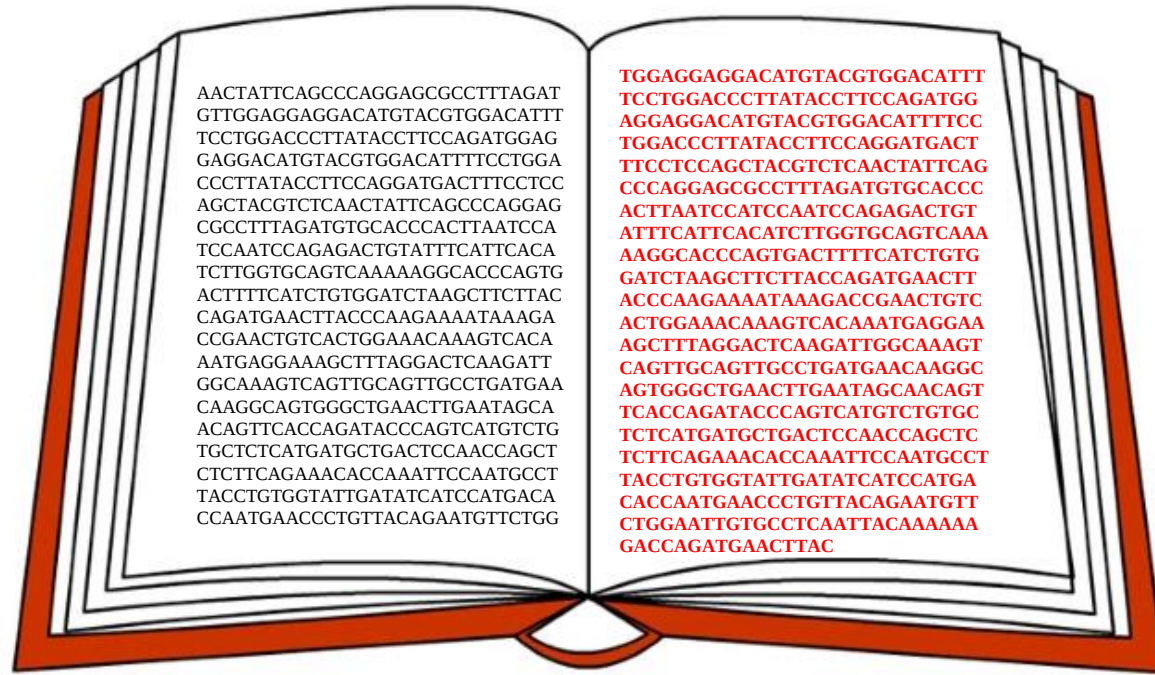


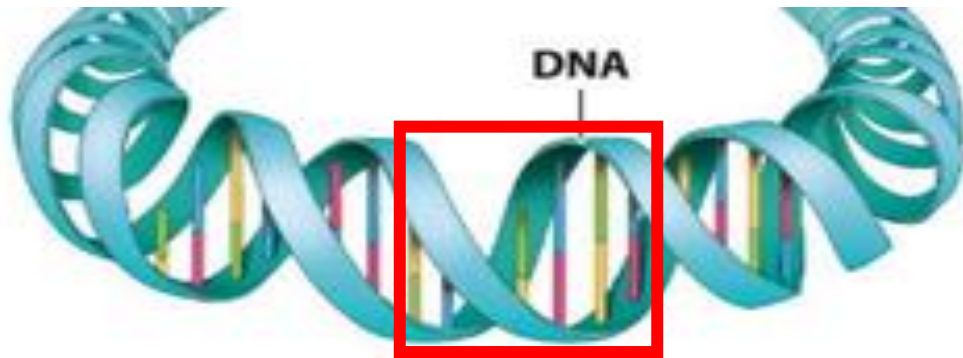
Incubatore: temperatura di crescita
controllata



Crescita delle colonie batteriche







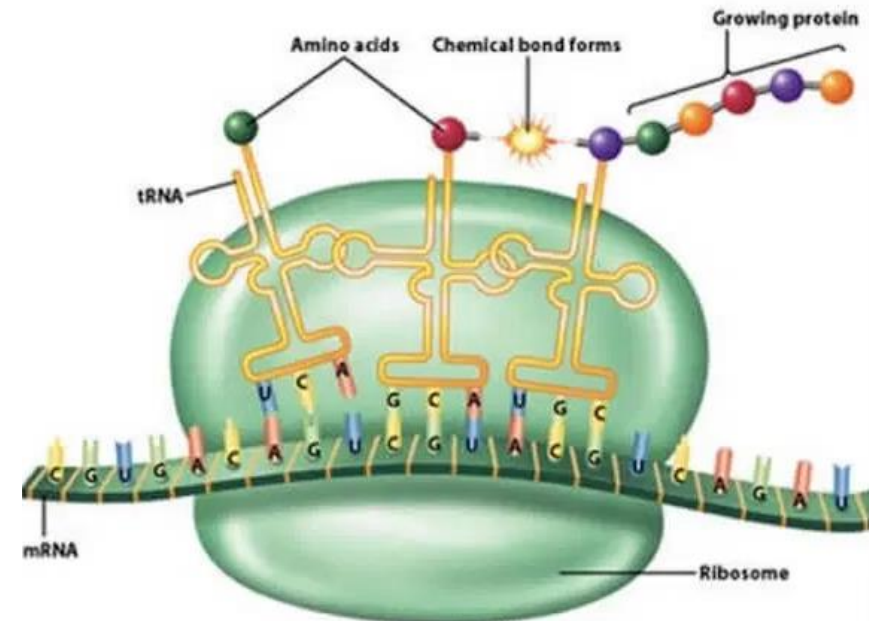
Gene rRNA 16S

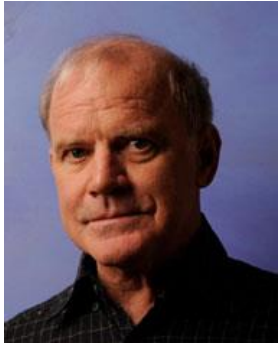


CONSERVED REGIONS: unspecific applications

VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

L'rRNA 16S è uno dei costituenti della subunità minore dei ribosomi. Il gene relativo è lungo circa 1,550 coppie di basi ed è composto da regioni variabili e regioni conservate. Viene utilizzato per l'identificazione dei batteri perché è presente in tutte le specie batteriche ed è un gene molto conservato, quindi i cambiamenti nella sequenza genica possono essere considerati come una misura del tempo (evoluzione).



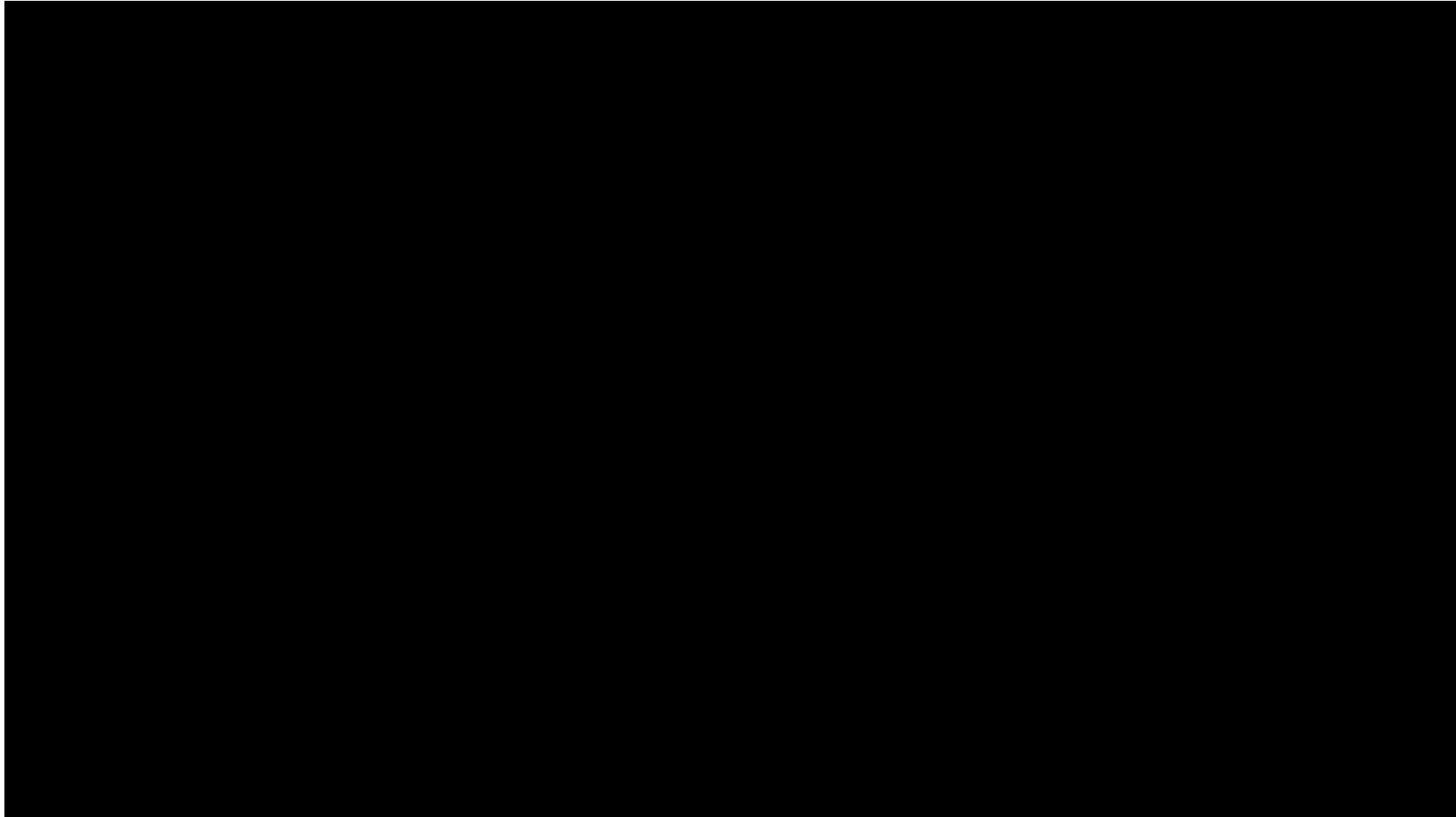


*Kary Mullis, inventore
della tecnica della
reazione a catena della
polimerasi (Polymerase
Chain Reaction o PCR)
nel 1983 - Nobel per la
Chimica nel 1993*

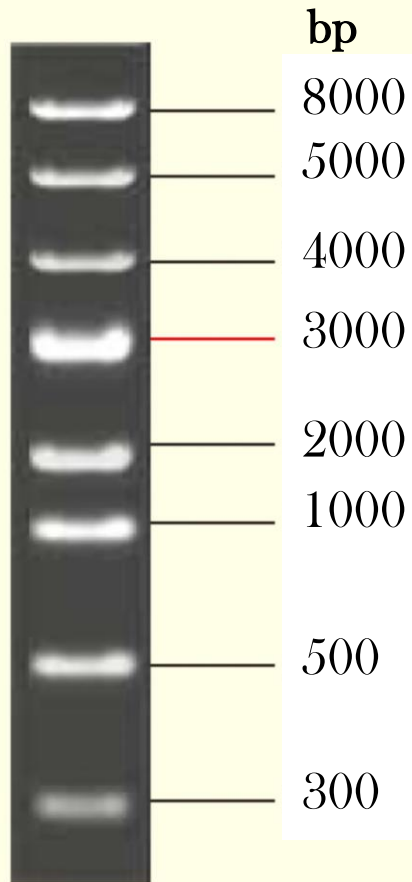


Thermal cycler
(it carries out the temperature cycles)

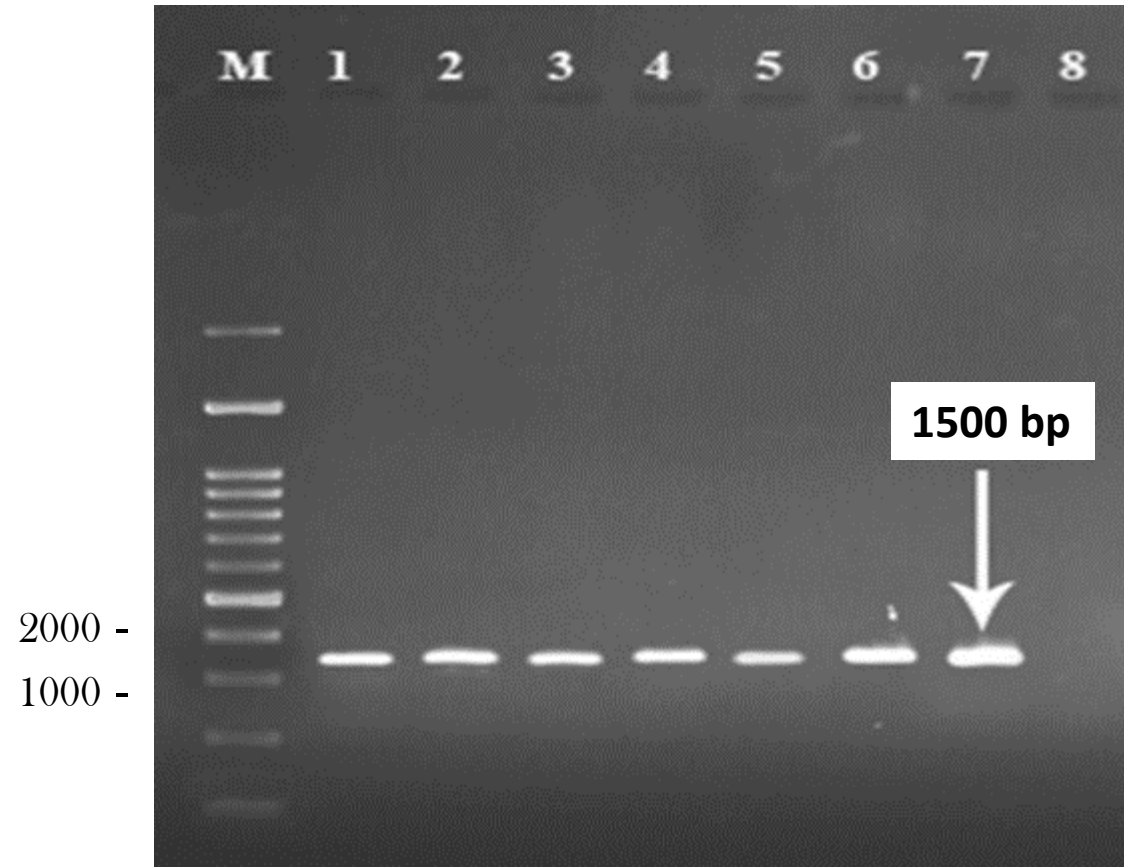




Trans5K[®] DNA Marker (5 µl)



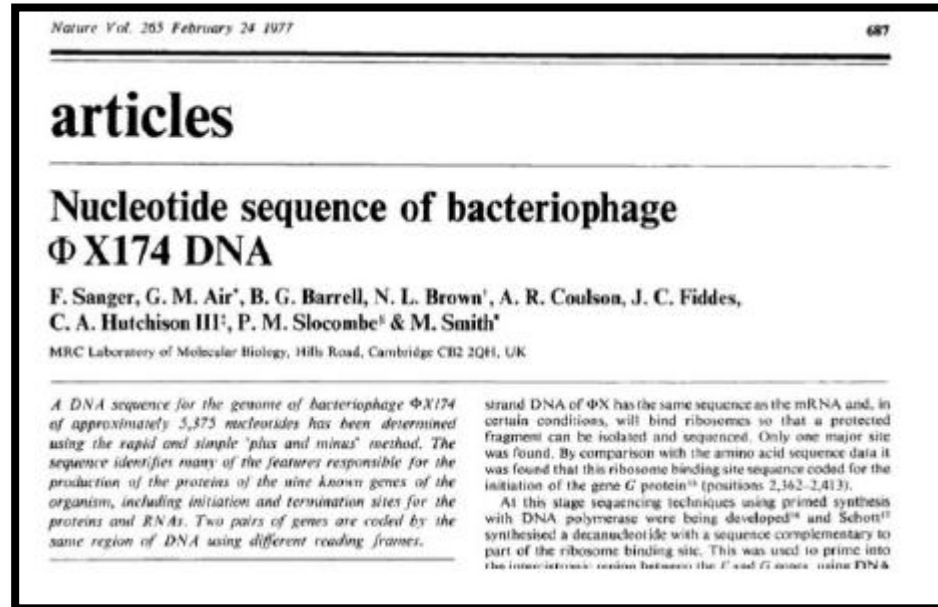
Miscela di frammenti di DNA a
lunghezza nota.



Sequenziare significa determinare l'ordine esatto dei monomeri che formano una biomolecola. Nel caso del DNA, il sequenziamento permette di ricostruire l'ordine dei nucleotidi (A, C, G e T).

ATGGAGGAGGACATGTACGTGGACATTTTCCTGGACCCTTATACCTTCCAGATGGAGGAGGACATGTACGTGGACATTTTCCTGGACCCTTATACCTTCCAGGATG
ACTTTCCTCCAGCTACGTCTCAACTATTTCAGCCCAGGAGCGCCTTTAGATGTGCACCCACTTAATCCATCCAATCCAGAGACTGTATTTTCATTCACATCTTGGTGCA
GTCAAAAAGGCACCCAGTGACTTTTCATCTGTGGATCTAAGCTTCTTACCAGATGAACCTTACCCAGAAAATAAAGACCCGAAGTGTCACTGGAACAAAGTCACA
AATGAGGAAAAGCTTTAGGACTCAAGATTGGCAAAGTCAGTTGCCTGATGAACAAGGAGTGGGCTGAAGTGAATAGCAACAGTTCACCATGATACCCAGATACCCAG
TCATGTCTGTGCTCTCATGATGCTGACTCCAACCAGCTCTCTTCAGAAAAGTTCCTGTAATGCCTTACCTGTGGTATTGATATCATCCATGACACCAATGAACCC
TGTTACAGAATGTTCTGGAATTGTGCCTCAATTACAGAATGTAGTTTTCCTGTAAATTGGATCTGAGAAAAATAGCTTTGAATGCCAAAAAC
ACAGAATATAATCCAAAGAGGTTTGCTGCAGTCATAATGAGGAGTTCAGCTCTTATATTTAGCTCTGGGAAAGTGGTCTGTACAGGAGCC
AAAAGTGAAGACGAGTCTCGGCTGGCAGCAAGAAAGTATGCTTTCCTCCCGTCAGATTCTTCAATTTTAAATTCAGAACATGGTT
GCAAGCTGTGATGTGAAATTTCCCATCAGGCTGGAGATTTTGTCTATCTGATTTATGAGCCTGAAGTTCCTGGCCTTATTTATAAGAT
GGTGAAACCGCAGGTTGTGCTGCTCATCTTTGCATCTGGAAATGACAGTTCAGGCTTCTGAGATCTACGAAGCATTGAAAACATGTATCCT
ATTCTAGAAAAGTTTAAAGAAAGTCTGAATGGAGGAGGACATATAGTTCCTCTTATACCATCCAGGATGACTTTTCCTCCAGCTATGTCTCAACT
GTTTCAGCCCAGGAGTGCCTTTAGACATGCACTCACTTCCATCTAATCCAGAGAGTTCACATCTTGGTGGAGTCAAAAAGGCATCCACTGACTTTTCAT
CTGTGGATCTAAGCTTCTTACCAGATGAACCTTACCCAAGAAAAATAGAGACCAAGGAAACAAGCTGGCAAGTGAGGAAAGCTGTAGGACTCGAGATC
GACAAAGTCAGTTGCAGTTGCCGATGAACATGGCAGTGAAGTGAAGTTCAGTTCACCATGATGCCAATGAACCTGTTCCAGGATTTTCTGGAATTGTGCCT
CAACCAGCCCTCTCCAGAAACACCAAACTCCAAATGCCCTTACCTGTGGCAATCCATGATGCCAATGAACCTGTTCCAGGATTTTCTGGAATTGTGCCT
CAATTACAGAATGTAGTTTCCACTGCAATCTGGCCTGTAAATTGGATCTATAGCCCTGAATGCCAAAAACACAGAATATAACCCAAAGAGGTTTGCT
GCAGTAATAATGAGGATCCGAGAGCCAAGGACAACAGCTCTCATCTTTGAAAGTGGTCTGTACAGGAGCCAAAAGTGAAGAGGAGTCTCGGCTGGC
AGCGAGAAAGTATGCTCGTGTGGTGCAGAAGCTCGGGTTCCTGTCAAGTTCCTTATTTTAAATTCAGAACATGGTTGGAAGCTGTGATGTGAAATTTCCCATC
AGGCTGGAGATTTTGGCACTAACCCTATCGGCAGTTCAGTAGTTATGAACCTGAAGTTCCTCCCGCCTTATTATAAGATGGTAAAACACAGGTTGTGTTGCTAA
TCTTTGCATCTGAAAAAGTTGTGTTAACAGGTGCCAAAGAGCGTTCTGTGAAGCATTGAAAACATGTATCCTATTCTAGAAAAGTTTAAAGAAAGTCTG
AATGGAGCAGGAGGAGACCTACCTGGAGCTCTACCTGGACCAGTGCGTATGGCCTTGCCCCACCCAGGTCTCCCTGTTTCAGCCCAGTTGTACCTTAT
GATATGTACATACTGAATGCATCCAATCCGGATACCTGCATTTAATTGCGATGCAAGAAACATCTGGTGATTTCTCATCTGTGGATCTTAGCTTCCTACC
AGATGAAGTTACCCAGGAAAAATAAAGACCAAGCTGTCTGATGAAGAAAGTTCGAAAGAAATCTGAAAGCCAAAGTCCACAAAGTAGGTTGCCATCACCCA
GCGAAGCAGGACGTTGGGCTGGGCTTAAACAGCAGCAGTGTGTCAAATTCCTATTCACAGCTGCACCTGGTGATCTGACTCAGTCCAGCCCTCTCCTGAGAAAC
AAACTCCGACTCCTTGTCTCTGGCATCCATAACTCCCATTGACACCAATGACCCCTATTTTCAAGATGTTGTGGAATTGTACCTCAACTACAGAATATAGTTTCCACTG
TAAACCTGGCCTGTAAAGTTGGATCTGAAGAAAAATAGCTTTGCATGCAAAAAATGCAGAATATAACCCAAAGAGGTTTGCTGCTGTCTATAATGAGGATCCGAGAGC
CCAGGACAACAGCCCTTATATTTAGCTCTGGGAAGATGGTCTGCACGGGAGCCAAAAGTGAAGAGCAGTCTCGACTTGCAGCAAGAAAAATATGCTCGTGTGGTGC
AGAAGCTTGGGTTCCCTGCCAGATTCTCGATTTTAAATTCAGAACATGGTTGGAAGCTGTGATGTGAGATTTCCCATCAGGCTGGAAGGTTTGGTGCTAACCCA
TCAGCAGTTCAGTAGTTACGAGCCTGAAGTGTTCCTGGTCTTATTTATAGAATGGTAAAACACGAATTGTGTTGCTTATCTTTGTATCTGGAAGAGTTGTGTTGA
CAGGTGCCAAAGAAGCTTCTGAGATCTATGAAGCATTGAAAACATCTATCTATTCTAAAAGGTTTAAAAAAGCCTGAGAAGTCCCCTGGGTAAGTTCAGGCA
GCTTCATTCTGAA

1977: sequenziamento del batteriofago Φ X174.



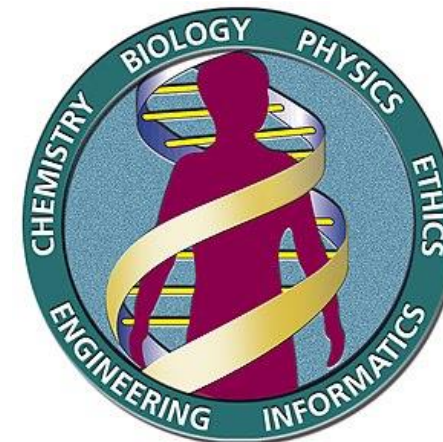
2001: sequenziamento del genoma umano

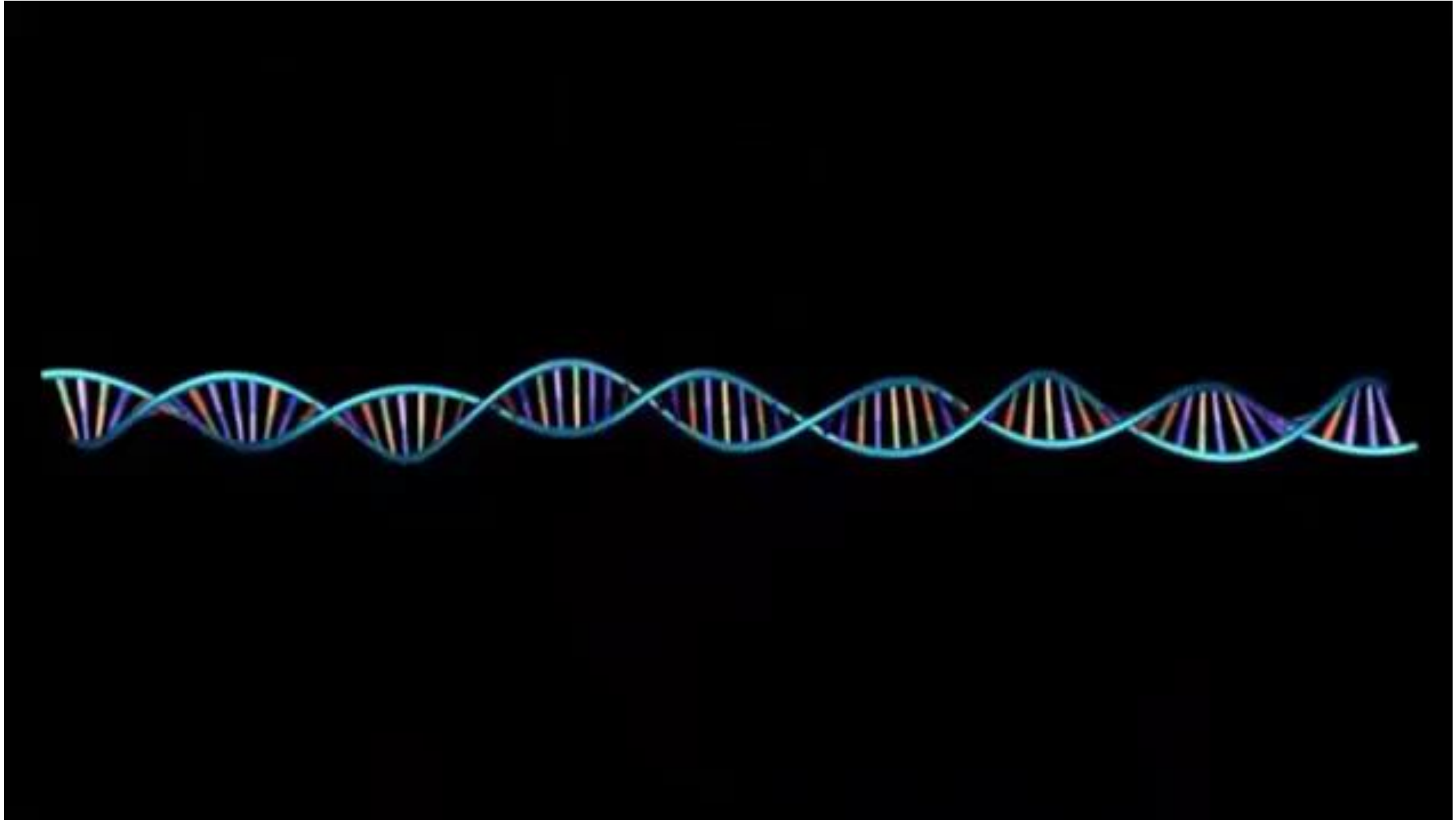


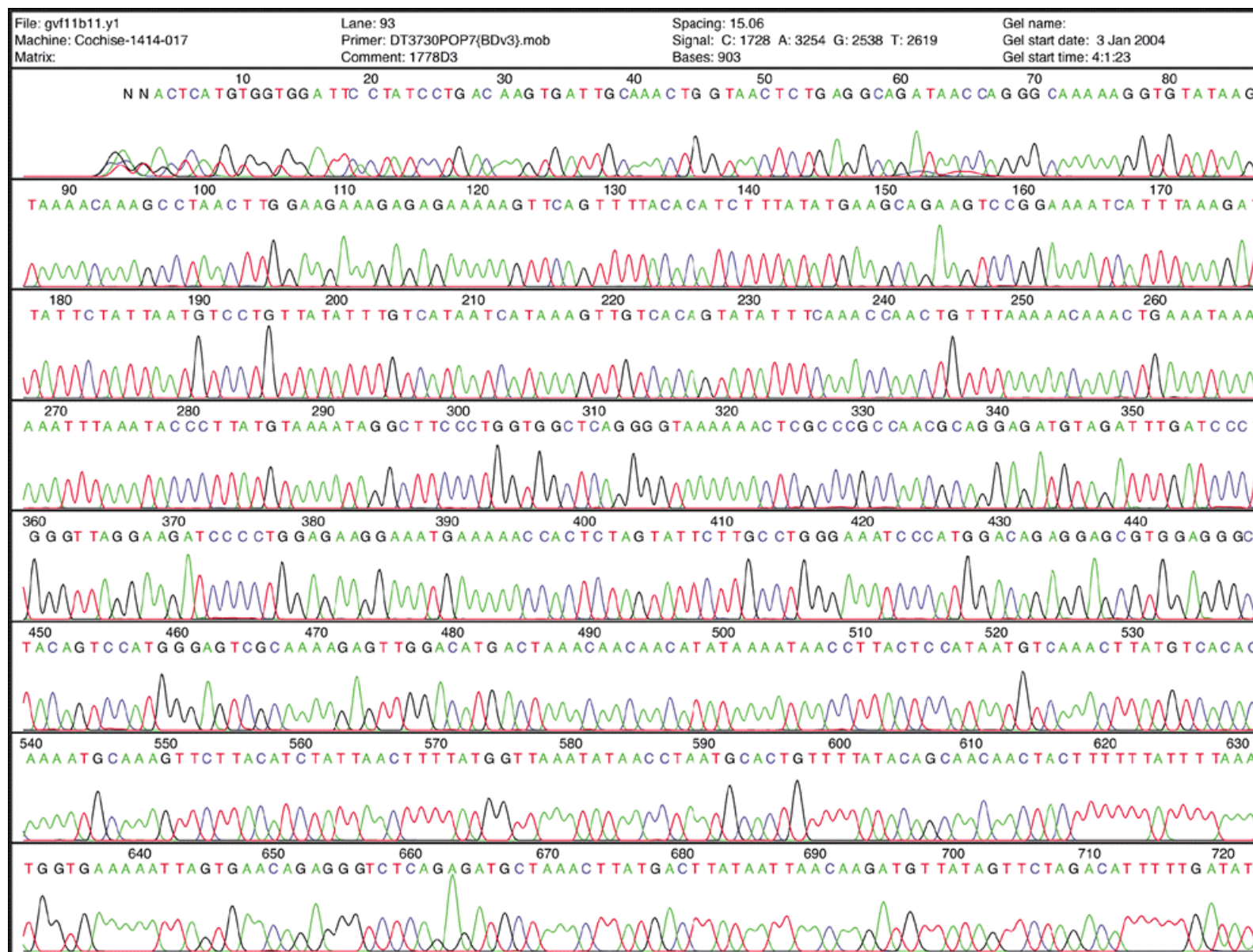
The Nobel Prize in Chemistry 1980



Paul Berg Walter Gilbert Fredrick Sanger







[Back to the Instructions](#)

Copy the sequence data below.

```
AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCACCTTTTAG
AGTGAGCGGCAAAACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGG
AATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCTCTATTTGGAGAAA
GATTTATCGGAGATGGATGAGCCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGGACAATGGGNGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAA
GGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCG
GAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGG
GGCTAGCGTTGTTTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATT
TAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGCTCAACCCTGGAACTGCCTTTGATACT
GGGTATCTTGAGTGTGGAAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTAAA
ATTGCTAGATATTTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCA
TTACTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCGGTTTACTGC
TCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCCTGGGGAGTACGGSSGCA
AGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATG
TGTTTAAATTGGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGA
TCGCGGAAGGTGGAGACACCCTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGT
GCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTGGGTTGGGCACTCTAG
GGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCT
CATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTG
GGCAGCGAAGTCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGG
ATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGG
ATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGGGG
CAGGCAACCACGGTAGGGCCAGCGACTGGGGTG
```

[Go to the NCBI site to perform your search.](#)



COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation.



[Public health information \(CDC\)](#) | [Research information \(NIH\)](#) | [SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#) | [Prevention and treatment information \(HHS\)](#)

BLAST® » blastn suite

[Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

Standard Nucleotide BLAST

blastn

blastp

blastx

tblastn

tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

Reset page

Bookmark

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file

Scegli file Nessun file selezionato [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

**New columns added to the
Description Table**

Click 'Select Columns' or 'Manage
Columns'.



Choose Search Set

Database

☒ Standard databases (nr etc.): ☐ rRNA/ITS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ Betacoronavirus

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism

Optional

Enter organism name or id—completions will be suggested

☐ exclude

[Add organism](#)

Range 1: 1 to 1410 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2531 bits(2806)	0.0	1410/1410(100%)	0/1410(0%)	Plus/Plus
Query 1	AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCACCTTTTAGAGTGAGCGG	60		
Sbjct 1	AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCACCTTTTAGAGTGAGCGG	60		
Query 61	CAAACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGAGAAATTT	120		
Sbjct 61	CAAACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAATAACACAGAGAAATTT	120		
Query 121	GTGCTAATACCGTATACGTCCTATTTGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCG	180		
Sbjct 121	GTGCTAATACCGTATACGTCCTATTTGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCG	180		
Query 181	TTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGA	240		
Sbjct 181	TTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGA	240		
Query 241	GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	300		
Sbjct 241	GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	300		
Query 301	GGGGAATATTGGACAATGGGNGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGC	360		
Sbjct 301	GGGGAATATTGGACAATGGGNGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGC	360		
Query 361	CCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCC	420		
Sbjct 361	CCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCC	420		
Query 421	CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTTA	480		
Sbjct 421	CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTTA	480		
Query 481	CTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGNCTCAAC	540		

Sequences producing significant alignments

Download New Select columns Show 100 ?

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) New [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	R.henselae 16S rRNA gene	Bartonella henselae	2531	2531	100%	0.0	100.00%	1410	gi 39295 Z11684.1
☒	Bartonella henselae complete genome, strain BM1374165	Bartonella henselae	2505	5010	100%	0.0	99.36%	1975503	gi 605047917 HG969191.1
☒	Bartonella henselae, strain BM1374163 complete genome	Bartonella henselae	2505	5010	100%	0.0	99.36%	1905383	gi 603661026 HG965802.1
☒	Bartonella henselae partial 16S rRNA gene, isolate BM1374163	Bartonella henselae	2505	2505	100%	0.0	99.36%	1477	gi 560879165 HG726041.1
☒	Bartonella henselae strain BNC08 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence	Bartonella henselae	2505	2505	100%	0.0	99.36%	1411	gi 354805260 JN646651.1
☒	Bartonella henselae 16S ribosomal RNA, partial sequence	Bartonella henselae	2505	2505	100%	0.0	99.36%	1444	gi 6626180 AF214556.1
☒	Bartonella henselae 16S rRNA gene, isolate FR96/BK38	Bartonella henselae	2505	2505	100%	0.0	99.36%	1447	gi 2828303 AJ223779.1
☒	Bartonella henselae 16S rRNA gene, isolate FR96/BK3	Bartonella henselae	2505	2505	100%	0.0	99.36%	1446	gi 2828302 AJ223778.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Baoan-cat-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000548 MK722246.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Baoan-cat-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000546 MK722245.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Nanshan-cat-11 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000544 MK722244.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Futian-cat-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000542 MK722243.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Longhua-cat-32 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000540 MK722242.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Longhua-cat-46 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000538 MK722241.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Longhua-cat-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000536 MK722240.1
☒	Uncultured Bartonella sp. clone Longhua-cat-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequ...	uncultured Bartonell...	2488	2488	100%	0.0	99.15%	1492	gi 1605000534 MK722239.1

Feedback

Reazione polimerasica a catena (PCR)

La mix di reazione deve contenere:

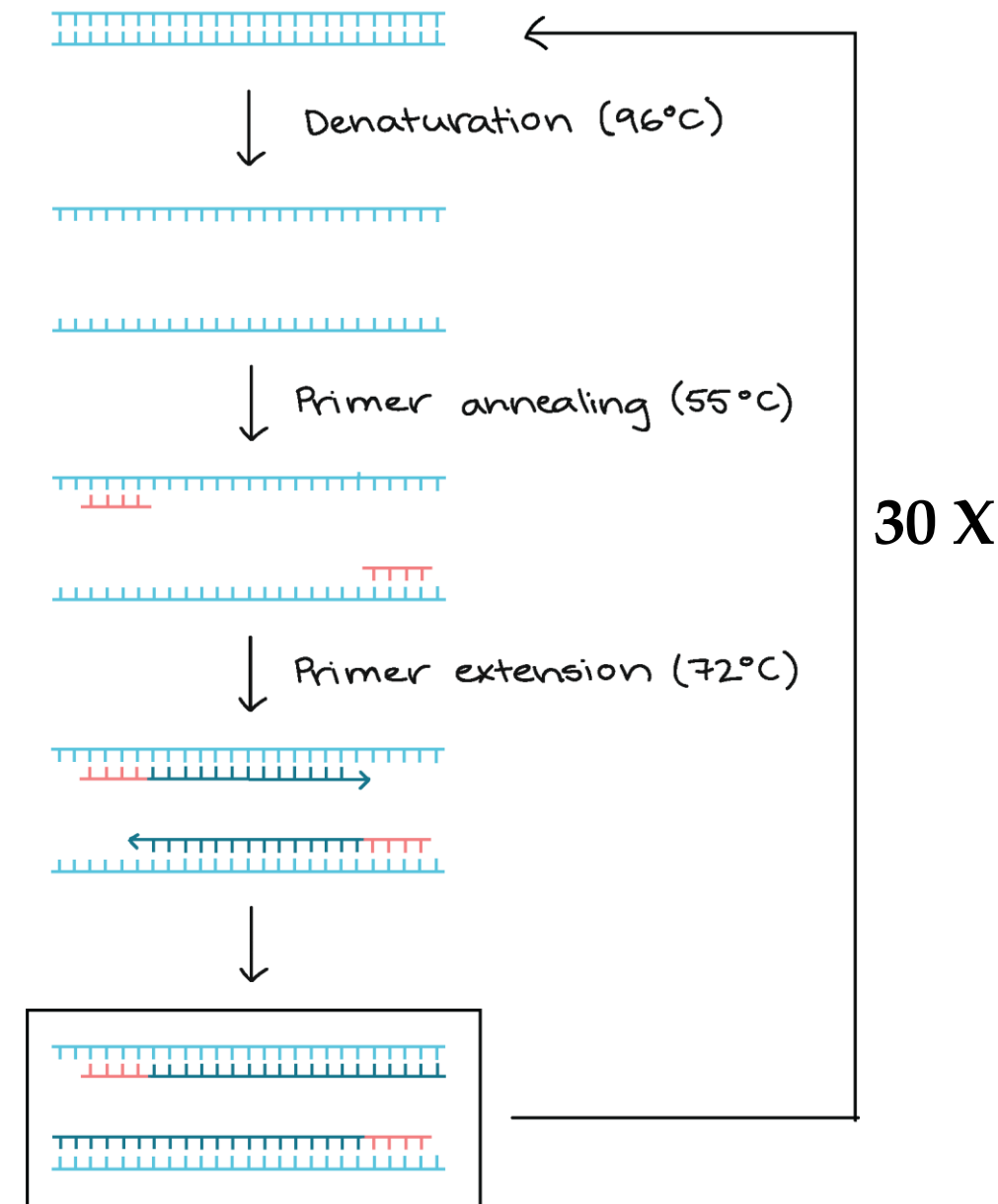
- DNA stampo
- Soluzione tampone contenente $MgCl_2$ (cofattore della DNA polimerasi)
- Primer forward
- Primer reverse
- Deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs)
- Taq polimerasi

La mix di reazione, preparata contemporaneamente per tutti i campioni, viene posta in ciascuna provetta, all'interno delle quali viene aggiunto il DNA stampo. Quindi le provette vengono agitate, centrifugate brevemente ed inserite nel termociclatore, uno strumento che permette di variare rapidamente la temperatura, in modo da far avvenire la reazione di PCR.



Un esperimento di PCR consiste in una serie di cicli reiterati (compresi tra 30 e 40), ciascuno dei quali è suddiviso in tre stadi:

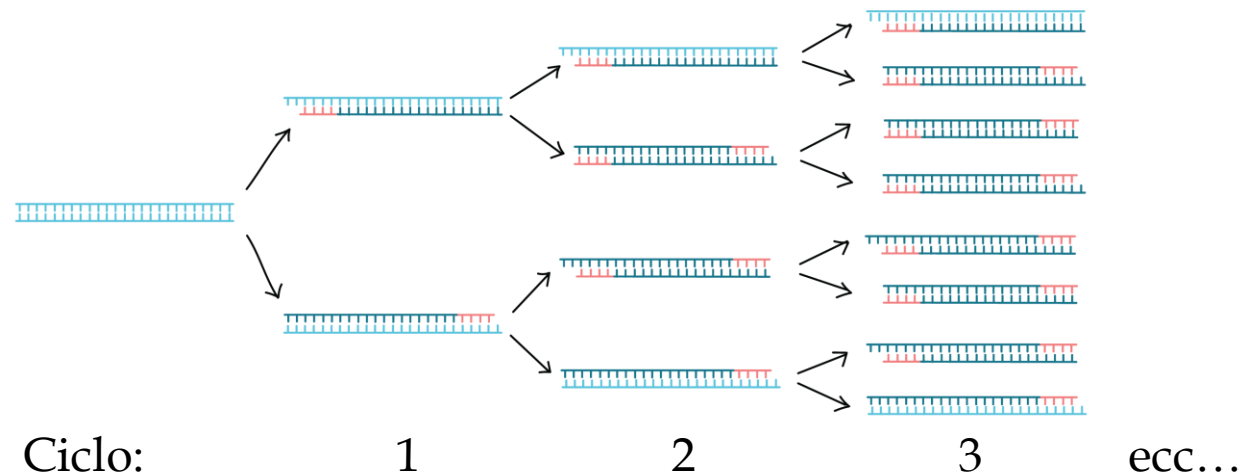
- ✓ **denaturazione** del DNA stampo effettuata di solito a 94-95°C: i filamenti di DNA si separano per effetto del calore che rompe i legami ad idrogeno tra le coppie di basi.
- ✓ **Ibridazione (annealing)** dei primers alle estremità 3' di ogni filamento denaturato, effettuata ad una temperatura pari a quella di Melting dei primers o al massimo 2-4 °C più bassa (una temperatura troppo bassa favorirebbe appaiamenti aspecifici, mentre una temperatura troppo alta potrebbe impedire l'appaiamento dei primers alla sequenza bersaglio).
- ✓ **allungamento** del filamento complementare mediante la Taq polimerasi, ad una temperatura generalmente compresa tra 68-72°C. La Taq polimerasi possiede un'attività polimerasica 5'-3', ma manca dell'attività 3'-5' esonucleasica (proofreading o correttore di bozze), per cui non è in grado di correggere eventuali errori di inserimento dei nucleotidi, commettendo così un errore ogni 104 - 105 nucleotidi aggiunti. Alcune DNA polimerasi termostabili, quali la Pfu polimerasi, isolata dall'organismo *Pyrococcus Furiosus*, possiedono l'attività esonucleasica 3'-5' di correzione di bozze, quindi il loro tasso di mutazione è ridotto.



Dopo un ciclo di reazione da una molecola di DNA se ne otterranno 2

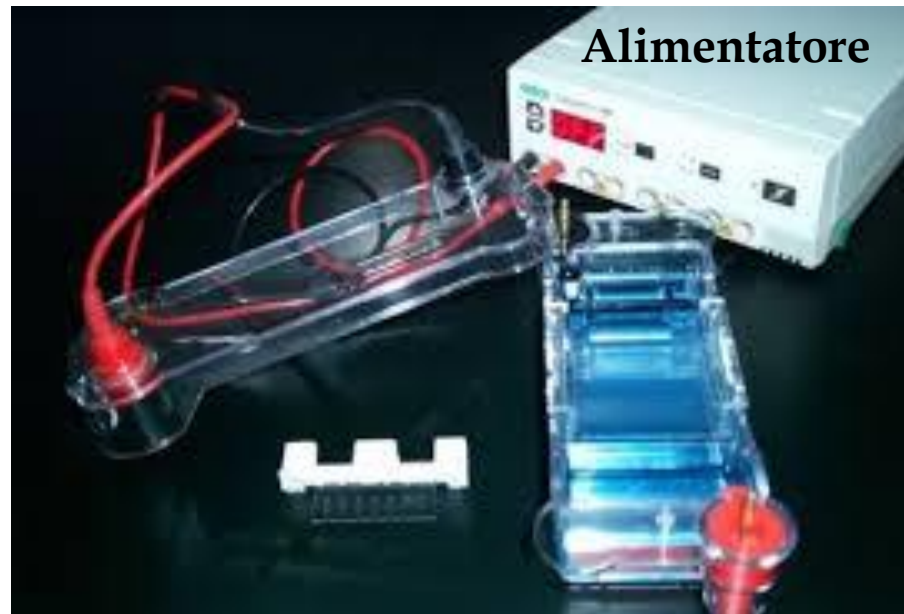
I cicli della reazione sono preceduti da una fase di denaturazione prolungata e seguiti da una fase di estensione prolungata, in modo da consentire una completa polimerizzazione di tutte le molecole. Una tipica reazione di PCR prevede i seguenti cicli:

- 1 ciclo di **denaturazione iniziale**: 95 °C per 2 minuti.
- 30 cicli di :
 - denaturazione** del cDNA stampo: 94°C per 45 secondi
 - ibridazione** dei primers allo stampo: 55-60°C per 1 minuto
 - allungamento** dei primers : 68°C per 1 minuto/1000 bp (il tempo dipende dalla lunghezza del DNA da amplificare, solitamente è di 1 minuto ogni 1000 nucleotidi)
- 1 ciclo di **allungamento finale** : 68°C per 10 minuti



Elettroforesi su gel di agarosio

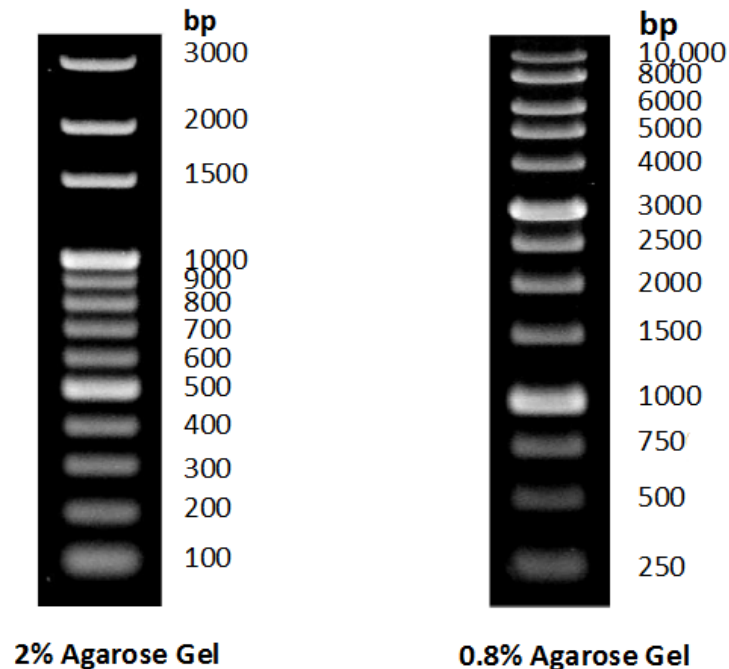
Il termine **elettroforesi** descrive la migrazione di molecole cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Molte molecole di interesse biologico, come acidi nucleici e proteine, ad un dato valore di pH presentano una carica netta positiva o negativa, di conseguenza, sotto l'azione di un campo elettrico, migreranno rispettivamente verso il catodo (-) o l'anodo (+), con una velocità direttamente proporzionale alla loro carica e inversamente proporzionale alla loro massa. L'apparecchiatura per l'elettroforesi comprende due componenti principali: una cella elettroforetica, nella quale si pone il gel, ed un alimentatore, che fornisce un flusso di corrente costante agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica.



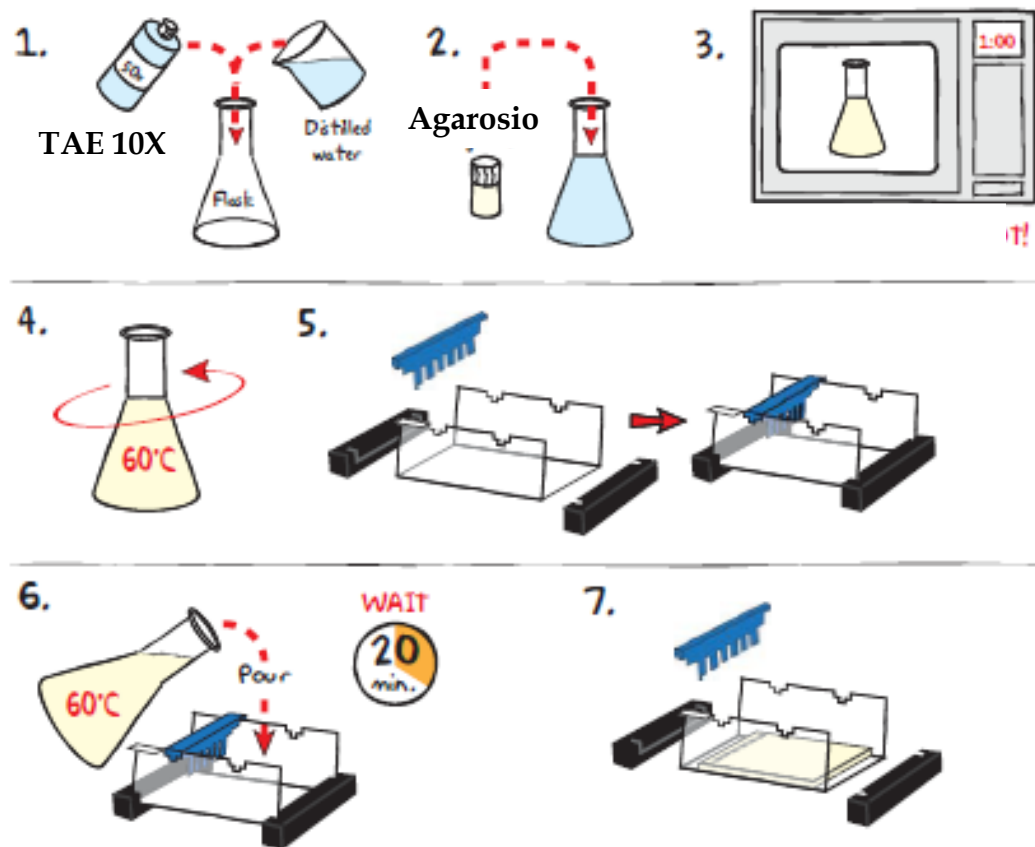
Cella elettroforetica

Elettroforesi su gel di agarosio

Per separare frammenti di DNA di lunghezza compresa fra 100 bp (bp = "base pair, indica il numero di coppie nucleotidiche complementari) e 10 kb (1 kb = 1000 bp) è l'elettroforesi su gel d'agarosio, un polisaccaride lineare neutro purificato dall'agar-agar delle alghe rosse. Per risalire alla dimensione dei campioni di DNA analizzati si utilizza una miscela di frammenti di DNA a lunghezza nota (markers). Il campione di DNA, prima di essere caricato su gel, viene trattato con una soluzione tampone costituita da un appesantente, come il saccarosio, necessario per aumentare la densità del DNA, e da un colorante che permette di visualizzare la corsa elettroforetica.

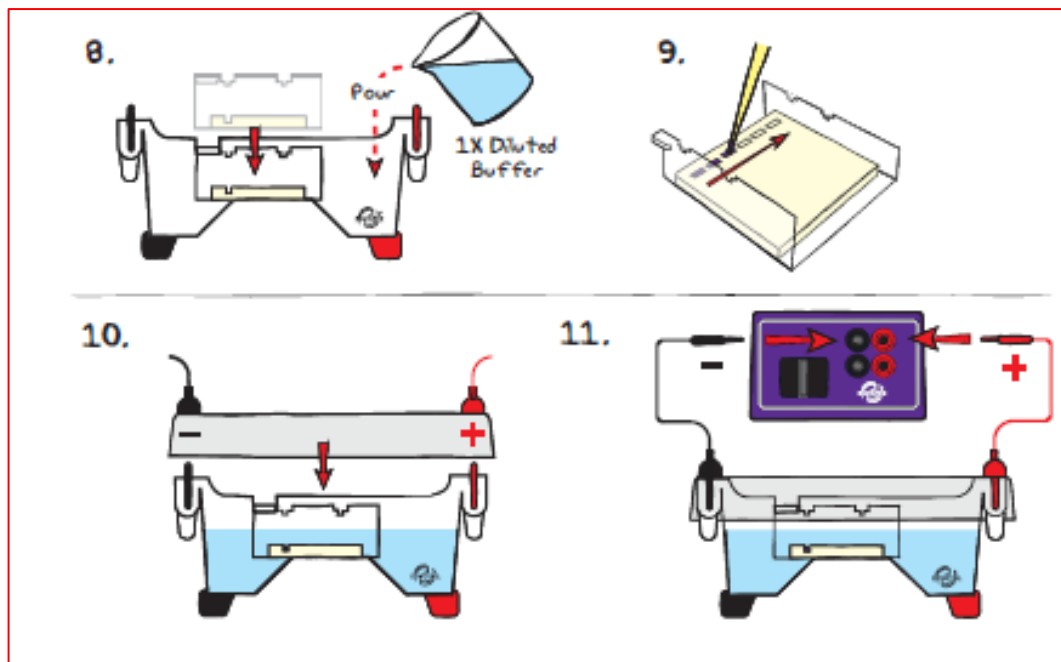


**Esempi di marcatori di
peso molecolare
(markers)**



La preparazione di un gel d'agarosio all'1% consiste nel solubilizzare 1 grammo di agarosio in 100 ml di tampone TAE 1X (Tris 40mM - Acido acetico 0.12% (V/V) - EDTA 1mM, pH 8) su un agitatore magnetico riscaldato o all'interno di un forno a microonde. Solitamente in laboratorio le soluzioni tampone vengono preparate più concentrate, per diluirle solo al momento dell'uso con acqua distillata.

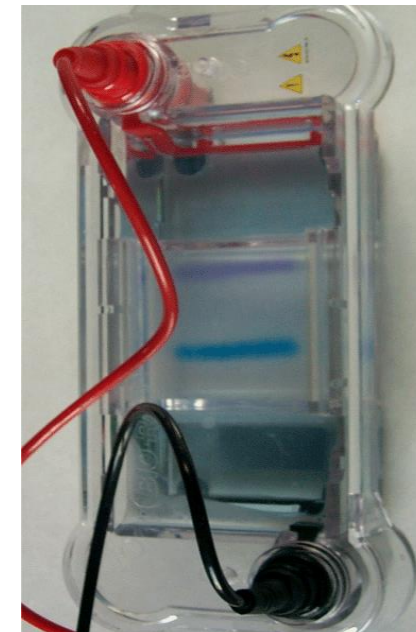
La soluzione ancora calda viene versata in una vaschetta nella quale è inserito un pettine che servirà a creare dei pozzetti utili per caricare il DNA.



Quando il gel si è solidificato, si estrae il pettine ed il gel viene posto in una vaschetta da elettroforesi, immerso in un tampone di corsa, sempre TAE 1X. Quindi si caricano i campioni e la corsa elettroforetica avviene a voltaggio costante (90/110 Volt)



Caricamento del gel con una multipipetta. Il colore blue dei campioni è dovuto alla presenza del colorante che consente di seguire la corsa elettroforetica.



Il gel viene immerso per 20 minuti in una soluzione contenente un colorante (come ad esempio il SYBERGREEN) che si intercala nella doppia elica del DNA ed emette fluorescenza. Le bande corrispondenti a frammenti di DNA di diverse dimensioni saranno visualizzate esponendo il gel alla luce di una lampada UV.

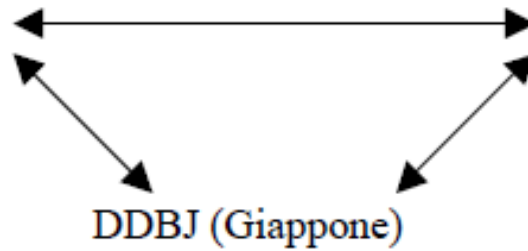


Banche dati primarie (sequenze nucleotidiche e aminoacidiche):

- ❑ *GenBank* (NCBI - National Center for Biotechnology Information),
- ❑ *EMBL datalibrary* (EMBL - European Molecular Biology Laboratory),
- ❑ *DDBJ* (DNA Database of Japan).

Questi istituti cooperano tra loro al fine di condividere e rendere pubblicamente disponibili tutti i dati di cui dispongono e differiscono tra loro solamente per il formato con cui tali dati vengono rilasciati.

EMBL datalibrary (Europa)



GenBank (USA)

DDBJ (Giappone)

✓ La maggior parte delle banche dati mettono a disposizione dei tool bioinformatici per l'elaborazione dei dati immagazzinati. Per la ricerca di **similarità** il tool più popolare è **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool), che può eseguire migliaia di confronti fra sequenze in pochi minuti.

✓ Per ricercare la similarità tra due o più sequenze è necessario allinearle, in modo da ottenere la **percentuale di identità**, correlata alla frazione di residui identici in posizioni corrispondenti sul totale dei residui delle sequenze allineate.

Ad esempio volendo allineare le due parole CANCELLO e PANNELLO

```
CANCELLO
  :: ::::
PANNELLO
```

riscontreremo una percentuale di identità pari a $6/8 \times 100 = 75\%$

Allineando le due parole PANNELLO e PENNELLO

```
PANNELLO
 : :::::
PENNELLO
```

riscontreremo una percentuale di identità pari a $7/8 \times 100 = 87,5\%$

La complessità del problema di allineare sequenze di acidi nucleici e di proteine deriva principalmente dal fatto che deve essere considerata la possibilità che il migliore allineamento comporti l'inserimento di "spazi" (*gap*) nelle sequenze.

Ad esempio le due parole MICROBIOLOGIA e MICOLOGIA possono essere allineate senza *gap* (ottenendo 6 sovrapposizioni) :

```
MICROBIOLOGIA
      :::::
MICOLOGIA
```

oppure consentendo la presenza di *gap* (ottenendo 9 sovrapposizioni)

```
MICROBIOLOGIA
   :::      :::::
MIC----OLOGIA
```

Esistono due possibili tipi di allineamento:

globale, che tenta di allineare il massimo numero di caratteri delle due sequenze, incluse le parti finali (si utilizza quando le due sequenze hanno lunghezza simile);

locale, che tenta di allineare solo pezzi di sequenze molto simili (l'allineamento termina quando termina la porzione di forte match). Si utilizza per allineare sequenze con lunghezza diversa, che presentano regioni fortemente conservate.

L'inserimento di **gap** è un'esigenza irrinunciabile in quanto nel corso dell'evoluzione si possono avere processi di inserzione e/o delezione che comportano una diversa lunghezza di sequenze omologhe. Si possono inserire **gap** in entrambe le sequenze. In particolare, allineando le due sequenze sottoriportate si contano 10 appaiamenti esatti:

```
      IPLMTRWDQEQESDFGHKLPITYTREWCTRG
      |||||
CHKIPLMTRWDQEQESDFGHKLPVIYTREW
```

inserendo un **gap** per sequenza se ne contano 25.

```
      IPLMTRWDQEQESDFGHKLP-IYTREWCTRG
      ||||| ||||| |||||
CHKIPLMTRWDQ-QESDFGHKLPVIYTREW
```

Quale dei due allineamenti deve essere considerato migliore?

Da un punto di vista computazionale l'allineamento migliore è quello che totalizza il punteggio maggiore, ma che dire dell'aspetto biologico? Gli allineamenti locali sono utili qualora si ricerchino domini particolari (ad esempio nelle sequenze proteiche) o situazioni particolari a livello di DNA (ad es.: introni, esoni, ecc.).



Ancestry + Traits Service

\$99

If you want the most comprehensive ancestry breakdown on the market.

- 2000+ Geographic regions



Health + Ancestry Service

\$199

If you want to get a more complete picture of your health with insights from your genetic data.



23andMe+™ Membership

\$199
+\$29 / YEAR

If you want our Health + Ancestry Service plus 10+ exclusive reports & features throughout the year.

← Everything in Essential, plus...



Offerta DNA per la Pasqua
Solo 59 € ~~79 €~~

[Ordina ora](#)

La promozione termina tra 2 giorni

2100+

REGIONI
GEOGRAFICHE



Lasciati stupire

Scopri le tue origini etniche e trova nuovi parenti con la nostra semplice analisi del DNA.

Solo 59 € ~~79 €~~

[Ordina ora](#)

Negli ultimi 18 anni, MyHeritage ha aiutato milioni di persone a trovare nuovi componenti della loro famiglia e a scoprire le loro origini etniche.

85

milioni

di utenti in tutto il mondo

13,1

miliardi

di documenti storici

4,5

miliardi

di persone negli alberi genealogici

42

lingue supportate

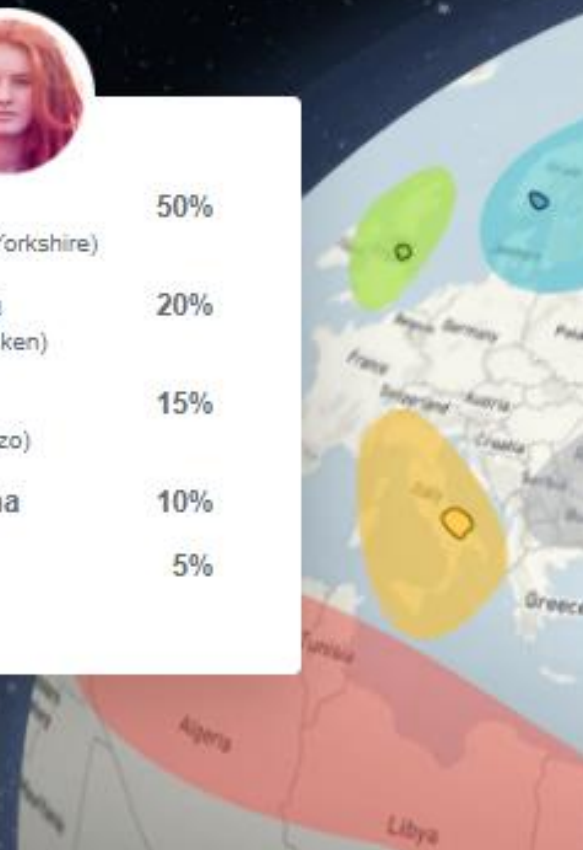
Da quale parte del mondo provenivano i tuoi antenati?

Le tue origini sono codificate nel tuo DNA e ci consentono di determinare da dove nel mondo provenissero i tuoi antenati. I tuoi risultati DNA comprenderanno una ripartizione etnica e identificheranno gli specifici gruppi da cui discendi tra **più di 2100 regioni geografiche**.

[Approfondisci](#)



Inglese	50%
Inghilterra (Yorkshire)	
Scandinava	20%
Norvegia (Viken)	
Italiana	15%
Italia (Abruzzo)	
Nordafricana	10%
+2 altre	5%



Non hai effettuato l'accesso

[Accedi](#)

[Registrati](#)

[Passa a Premium](#)

[Aiuto](#)

[Italiano](#)



[DNA](#)

[Albero](#)

[Ricerca](#)

[Aiuto](#)



Offerta DNA per la Pasqua

Solo 59 € ~~79 €~~

[Ordina ora](#)

La promozione termina domani!

Corrispondenze DNA

Trova parenti che non sapevi esistessero

[Ordina ora il corredo DNA](#)



SCIENZA

CONSUMISMI

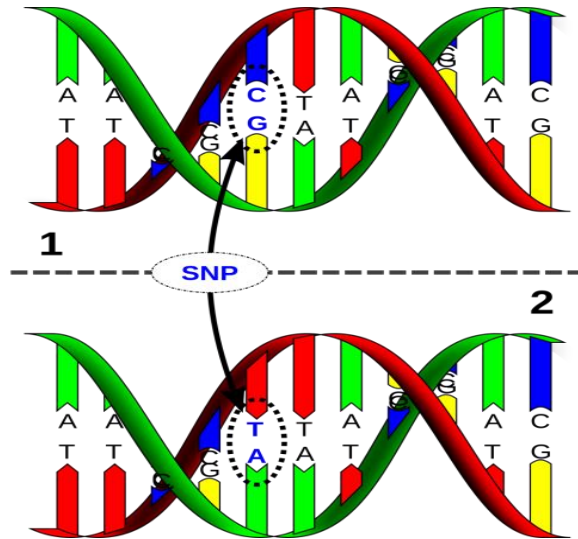
DOMENICA 12 GENNAIO 2020

Ci si può fidare dei test per l'analisi del DNA che si comprano su internet?

Sono quelli che sostengono di poter dare informazioni sui propri antenati analizzando un po' di saliva: la risposta breve è no

di Ludovica Lugli

Nella popolazione umana il 99,9% del DNA è identico in tutti gli individui. Solo lo 0,1 % mostra variabilità. La fonte principale della variabilità genetica fra gli individui è rappresentata dai polimorfismi a singolo nucleotide (**SNP, single nucleotide polymorphism**), ovvero variazioni di 1 posizione nucleotidica, presenti ogni 500-1000 bp. Gli SNPs sono responsabili della diversa suscettibilità degli individui alle malattie e della diversa risposta ai farmaci.



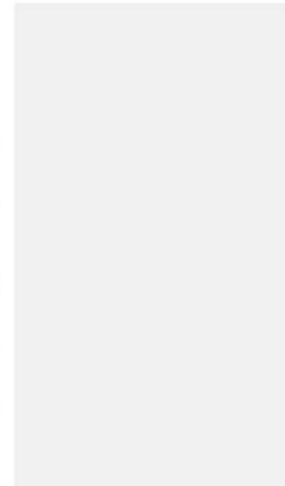
“If were not for the great variability between individuals, Medicine might be a Science, not an Art”
Sir William Osler “The principles and practice of Medicine, 1892

- ❑ Le aziende citate, raccogliendo campioni di DNA da molte persone, hanno un proprio database relativo alla distribuzione mondiale di diverse combinazioni di SNPs. Quello che fanno è dire a chi ha fatto un loro test quale percentuale dei propri SNPs hanno in comune con diverse popolazioni del mondo, a seconda di quanti dati hanno nel loro database su quelle popolazioni.
- ❑ Il problema è che avere il 5% di combinazioni di SNPs in comune con la popolazione della Germania, non significa che il 5% dei propri antenati sia tedesco: significa che gli SNPs del proprio DNA sono per il 5% uguali a quelli che contraddistinguono, in media, i tedeschi nel database dell'azienda con cui si è fatto il test. Se dunque pochissimi nordafricani hanno fatto analisi del DNA con quell'azienda, è improbabile che i dati sui nordafricani siano affidabili e facendo il test con un'altra azienda, con un proprio database, si potrebbe ottenere un risultato diverso.
- ❑ Inoltre il confronto non avviene con gli SNPs che una certa popolazione aveva uno, due o tre secoli fa, quando vivevano gli antenati su cui non abbiamo informazioni, ma su quelli di oggi: dunque i test non ci dicono dove vivevano i nostri antenati, ma solo dove vivono oggi le persone con cui abbiamo un DNA più simile, tra cui molti nostri parenti, ma viventi.

- ❑ Questi test potrebbero far pensare che si possano definire diversi gruppi umani sulla base del DNA, quando non è così: le “razze” all’interno della specie Homo Sapiens non esistono.
- ❑ Altro aspetto importante è la privacy. Negli Stati Uniti 23andMe e le altre aziende che vendono test del DNA da fare a casa vendono i dati genetici dei propri clienti, in forma anonima e aggregata, a case farmaceutiche che fanno ricerca sulle malattie che hanno o potrebbero avere cause genetiche.

La storia dell’arresto del presunto “Golden State killer”

Come un uomo accusato di oltre 10 omicidi e circa 50 stupri è stato arrestato dopo 40 anni grazie a una traccia di DNA e a un sito gratuito



- ❑ Infine, non ha senso neanche fare i test per ragioni di salute, come spiega il genetista Giuseppe Novelli, rettore dell'Università Tor Vergata di Roma.

«La stragrande maggioranza dei test attualmente offerti al consumatore, è scientificamente valida, ma è inutile. (...) È fondamentale che chi si sottopone a un test genetico, effettui una consulenza, pre e post-test, con un genetista, perché le informazioni genetiche bisogna saperle leggere, interpretare e gestire.

Solo in rari casi i geni sono l'unico fattore in gioco quando si sviluppa un problema di salute e i risultati dei test fatti attraverso internet possono risultare ingannevoli se consultati senza tener presente questa e altre cose. La genetica è una materia molto complessa, basata in gran parte su analisi probabilistiche e su cui molta ricerca deve ancora essere fatta: certi test possono dare l'illusione che leggendo il DNA si possa conoscere il proprio futuro, ma non è così.»



Migliaia di persone l'hanno già fatto. Con pochi click e qualche goccia di saliva, chiunque può acquistare online una scansione del proprio DNA e ricavarne un profilo genetico personalizzato. È l'alba della genomica di consumo, che unisce i progressi della biologia alle potenzialità di internet. Per meno del prezzo di un cellulare possiamo guardare nel nostro patrimonio genetico e ottenere informazioni sul rischio futuro di malattie, sulla tolleranza ai farmaci, sulle nostre origini genealogiche ed etniche, e condividere questi dati in rete. Il social networking genetico, oggi agli inizi, assume i contorni di un fenomeno di massa destinato a pervadere la nostra vita quotidiana e a cambiare il modo stesso di relazionarci con gli altri.

Ma quanto sono attendibili le promesse di chi vuole leggere il nostro DNA? Ed è davvero possibile prevenire le malattie partendo da un rischio scritto nei nostri geni? Infine, chi ci dice che un giorno questi dati non potranno venire usati contro di noi?

Per esplorare questo nuovo mondo, Sergio Pistoï, biologo e giornalista scientifico, ha affidato il proprio DNA a uno dei tanti siti di genomica personalizzata. È nato così questo libro che, attraverso l'esperienza diretta dell'autore, disegna le prospettive della genomica di massa, trasmettendoci le speranze, ma anche i rischi e l'angoscia di trovarsi faccia a faccia con il proprio profilo genetico.