

# **Tecniche molecolari**

## Biotechnologie applicate all'ispezione degli alimenti di origine animale

Dip. di Medicina Veterinaria e Produzioni animali

tiziana.pepe@unina.it

Ulteriori applicazioni di biologia molecolare:

- **RFLP**

- **Sequenziamento**

Evoluzioni della tecnica PCR:

- **Nested PCR**

- **Multiplex PCR**

- **Real Time PCR**

**RFLP:** acronimo di Restriction Fragment Length Polymorphism

Consiste nell' analisi dei polimorfismi di lunghezza di frammenti del DNA ottenuti per digestione con enzimi di restrizione

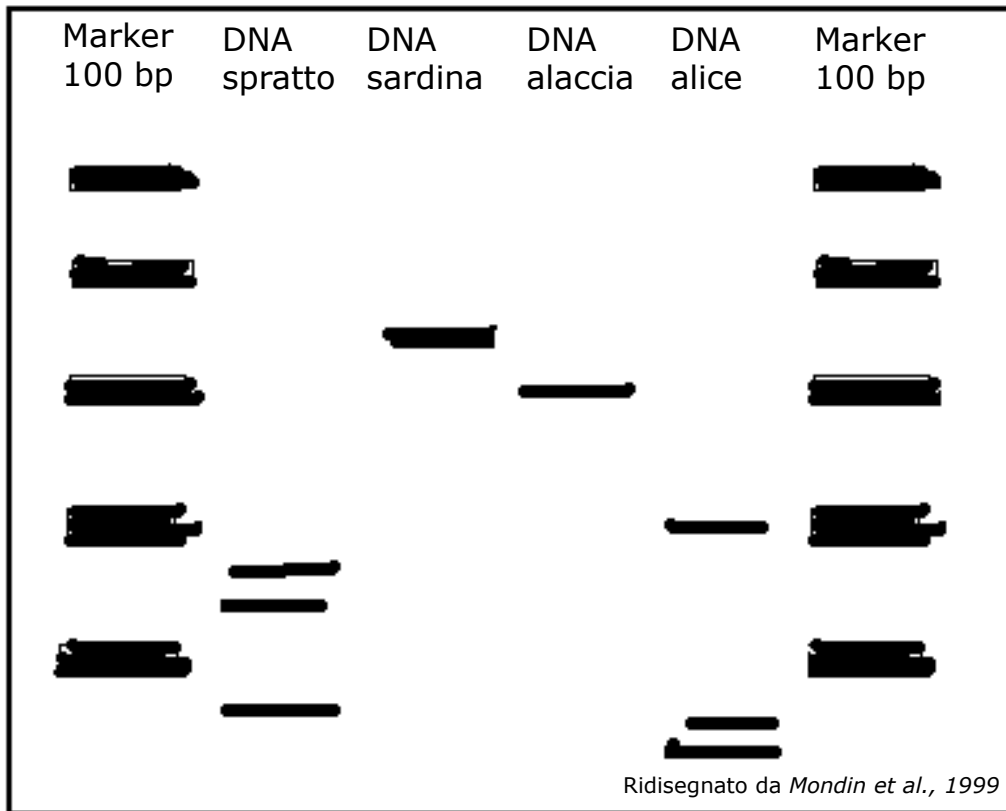
Tale tecnica è utilizzata, ad esempio, per il riconoscimento di specie

Enzimi batterici che riconoscono e tagliano il DNA a doppia elica in siti specifici.

In natura sono utilizzati dalla cellula batterica per difendersi dall'invasione di DNA estranei, per lo più di origine virale.

Gli enzimi di restrizione permettono di frammentare il genoma in punti precisi e, soprattutto, in maniera **riproducibile**.

- 1) Il DNA estratto e purificato può essere digerito con enzimi di restrizione di sintesi (endonucleasi) che tagliano in maniera specifica le sequenze nucleotidiche
- 2) I frammenti così ottenuti sono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio
- 3) Lo studio dei pattern di restrizione consente il riconoscimento di specie



**Corsa elettroforetica di frammenti di restrizione specie-specifici di alcune specie ittiche**

E' una tecnica che consente di ottenere la massima informazione su una molecola di DNA determinandone la sequenza nucleotidica completa.

Determinare la sequenza di una specifica regione di DNA è indispensabile per la messa in atto di qualsiasi procedura atta alla manipolazione del DNA.

Sequenziare un frammento di DNA specie-specifico consente di riconoscere la specie di provenienza a partire da alimenti di origine animale.

Per effettuare il sequenziamento di un frammento amplificato di DNA è necessario allontanare eventuali residui di proteine, RNA, frammenti cellulari, ecc. tramite:

- Purificazione del DNA su colonnine a scambio ionico

Successivamente si effettua :

- Verifica tramite elettroforesi su gel di agarosio della concentrazione del DNA purificato
- PCR di sequenziamento

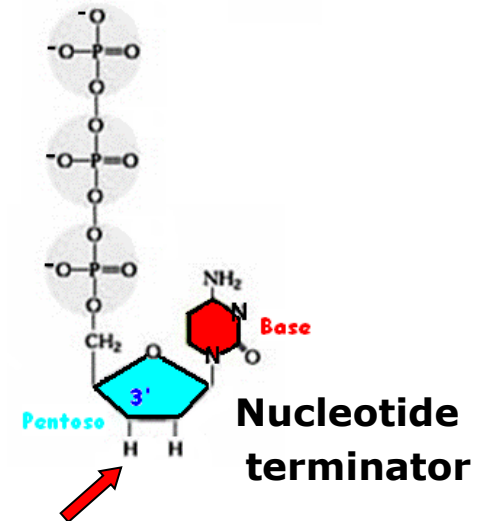
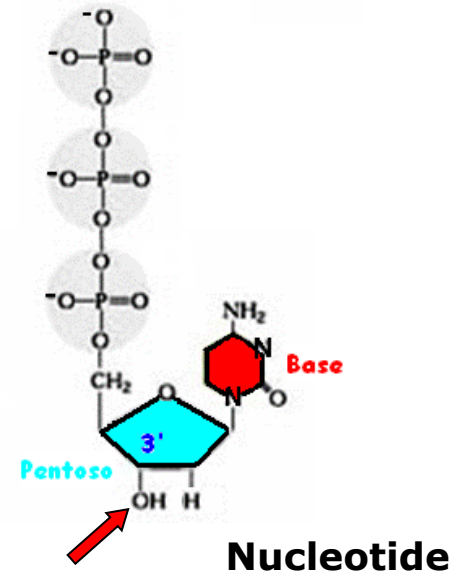
La PCR di sequenza consiste nella ri-amplificazione del frammento di DNA utilizzando:

### **Miscela della PCR di sequenziamento**

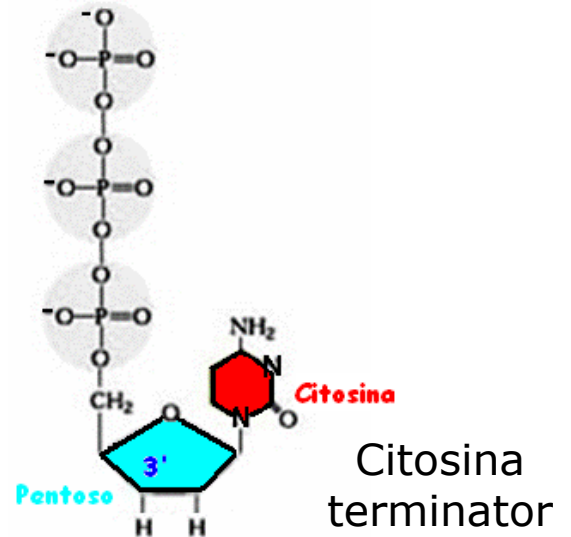
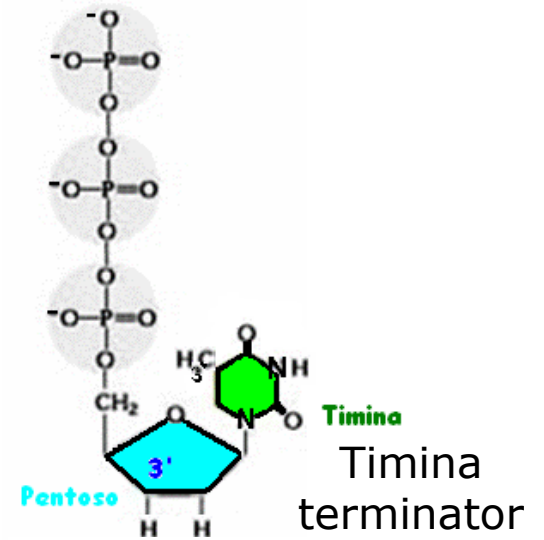
- DNA amplificato
- Primer forward/ reverse
- Soluzione tampone
- DNA Polimerasi
- Nucleotidi
- Nucleotidi terminator**

Sono nucleotidi privi **del gruppo ossidrilico** (-OH) all'estremità 3' del desossiribosio.

Tale mancanza impedisce il legame tra i nucleotidi e blocca l'allungamento del filamento di acido nucleico.



- I nucleotidi terminator sono marcati con fluorocromi differenti (adenina-terminator, guanina-terminator, citosina-terminator, timina-terminator).



- Il sequenziatore sottopone il prodotto della PCR di sequenziamento ad elettroforesi all'interno di un capillare.

- Un raggio laser colpisce il capillare eccitando la fluorescenza dei fluorocromi.

- Ciascuno dei quattro fluorocromi (un fluorocromo diverso per ogni base azotata) emette fluorescenza con diversa lunghezza d'onda.



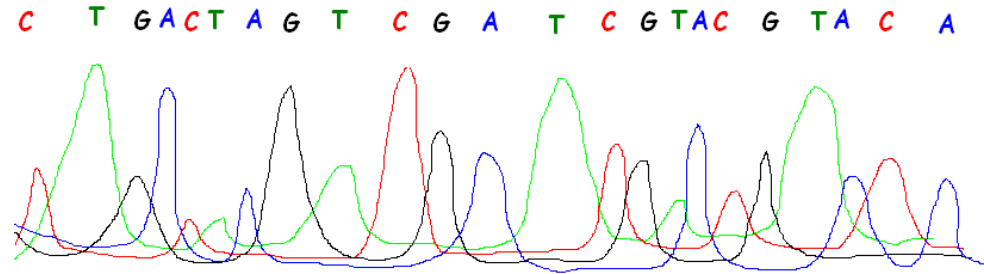
**Sequenziatore automatico ABI Prism**  
da [www.appliedbiosystems](http://www.appliedbiosystems)

- Una cellula fotoelettrica all'interno del sequenziatore rileva il tipo e l'intensità luminosa emessa dai fluorocromi eccitati dal laser.

La fluorescenza è registrata in forma grafica come picchi

- La sequenza dei picchi corrisponde alla sequenza dei nucleotidi.

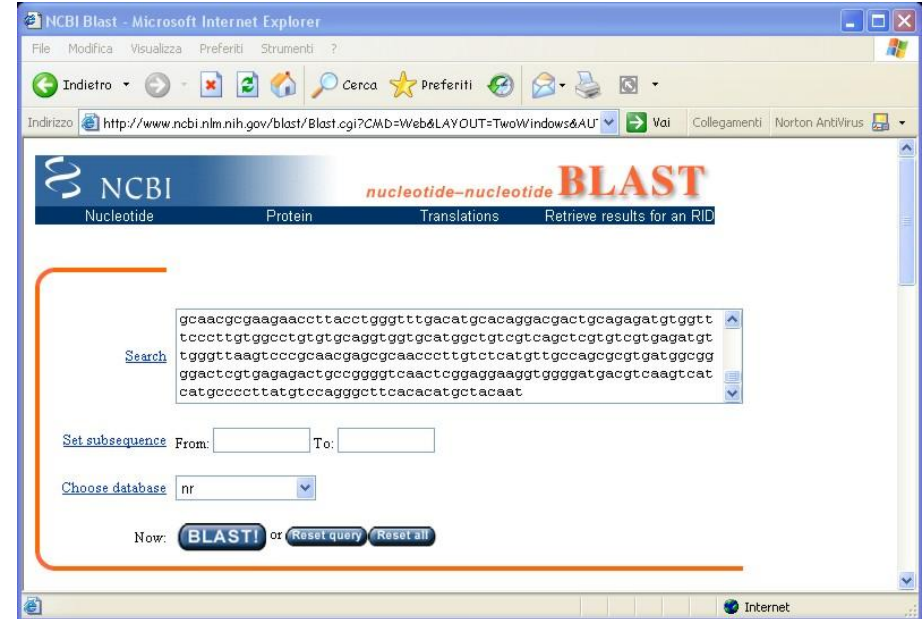
- Il colore del picco corrisponde al tipo di base azotata (l'intensità o altezza del picco invece è irrilevante).



L'elettroferogramma da' la sequenza nucleotidica:  
CTGACTAGTCGATCGTACGTACA

La sequenza ottenuta viene inserita in GenBank, una banca dati pubblica contenente circa 50 milioni di sequenze geniche di tutti gli organismi viventi e analizzata attraverso software dedicati (Blast, Bioedit, ecc.).

Il motore di ricerca individua le sequenze presenti in database che hanno il più elevato grado di omologia con la sequenza in esame.



Esempio di analisi di sequenza attraverso software dedicati (Blast).

Da [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)