



## **“Sperimenta il BioLab”**



**Che specie di pianta è?  
Dall'estrazione del DNA al nome scientifico della specie  
utilizzando il DNA Barcoding**

Università degli Studi di Milano  
Settore Didattico, via Celoria 20, Milano  
Laboratorio 105

## DNA Barcoding

Il codice a barre del DNA (DNA Barcoding) è una sequenza di DNA che identifica in modo univoco ogni specie vivente, proprio come il codice a barre di un prodotto identifica ogni oggetto in vendita in un negozio. Gli studenti utilizzeranno il codice a barre del DNA per esplorare la biodiversità in campo vegetale (Fig. 1).

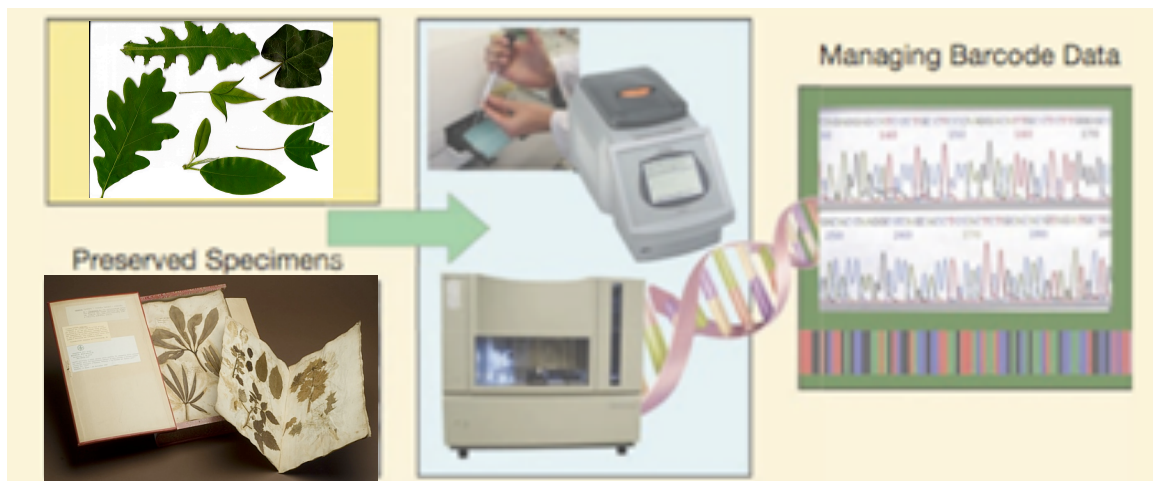


Fig 1. Dal campionamento del materiale biologico, grazie all'estrazione del DNA e alla PCR, al sequenziamento del gene specie-specifico.

L'idea di proporre questa attività è nata dalla consapevolezza che affrontare in laboratorio argomenti difficili, quali il sequenziamento del DNA, il barcode genetico etc., sia più facile e intuitivo e inoltre questi temi sono molto adatti per approfondimenti interdisciplinari utilizzando la bioinformatica e le tecnologie multimediali più innovative.

## Cornice scientifica

La Tassonomia è la Scienza che individua e organizza le specie in gruppi sulla base di caratteristiche comuni. Fino a poco tempo fa, tutte le classificazioni tassonomiche si avvalevano di esperti capaci di valutare soggettivamente le poche e, a volte sottili, differenze tra due specie. La situazione è radicalmente cambiata con l'avvento del codice a barre del DNA, che permette di effettuare una identificazione oggettiva di una specie, basandosi sulla sequenza di opportuni geni "marcatori" (Fig. 2). I geni marcatori utilizzati per la definizione del codice a barre di animali, piante e funghi hanno sequenze sufficientemente diverse tra specie e specie in modo che ogni sequenza identificata possa essere univocamente attribuita ad una unica specie di origine.

Il codice a barre del DNA (DNA barcoding) è rapidamente diventato uno strumento essenziale per gli studi tassonomici, ma trova applicazioni anche in altri campi, come nel monitoraggio ambientale, nell'analisi della biodiversità di un ecosistema etc.

Tutti coloro che utilizzano questa metodologia inviano i risultati del loro lavoro al Consorzio per il Codice a Barre della Vita (CBOL, Consortium for the Barcoding Of Life), un movimento internazionale che associa musei di storia naturale, erbari, giardini zoologici, istituti di ricerca, agenzie governative e intergovernative, associazioni non governative, compagnie private e altre organizzazioni coinvolte nella ricerca tassonomica e nei temi della biodiversità. Questo movimento coinvolge più di 200 organizzazioni in più di 50 paesi nei 6 continenti.

I dati raccolti dal CBOL a partire dal 2003, oltre un milione e mezzo di "record" che coprono più di 150.000 specie (dati relativi al 31.3.2012), rappresentano solo una piccola parte della biodiversità totale della terra, ma il loro numero sta crescendo in modo significativo di anno in anno. La banca dati del CBOL è accessibile dal sito [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org) che fornisce anche strumenti informatici molto sofisticati per identificare la specie a cui appartiene una data sequenza di DNA.



Nella banca dati, per ogni specie sono catalogate tutte le sequenze di codice a barre disponibili, il luogo e il modo in cui sono stati raccolti i campioni, le relative immagini e le connessioni Web ad altri siti utili.

Per fare solo alcuni esempi, l'importanza del codice a barre del DNA è evidente nel recente lavoro condotto dai Royal Botanic Gardens di Kew in collaborazione con il Missouri Botanical Gardens, che ha eliminato, in quanto già presenti, 600.000 nomi di piante fiorite da un milione di nomi registrati. Al



contrario, uno studio della biodiversità del Costa Rica utilizzando il codice a barre del DNA ha evidenziato che un tipo di farfalla (*Astrartes fulgerator*), studiata e classificata dal 1775, è in realtà rappresentata da dieci specie distinte.

## La tecnica del DNA barcoding: stato dell'arte

I geni "barcode" sono stati individuati e scelti in quanto la loro sequenza è molto conservata, ma significativamente diversa tra le varie specie; tali geni sono dei marcatori affidabili per identificare rapidamente le diverse specie, a partire da un campione di DNA.

### Requisiti di un gene barcode

La sequenza di un gene barcode deve essere sufficientemente diversa tra specie e specie in modo che ogni sequenza identificata possa essere univocamente attribuita ad una unica specie di origine. Dal momento che, in molti geni, si osservano variazioni di sequenza anche all'interno di una specie, la variazione tra specie diverse (inter-specie) deve essere maggiore della variazione all'interno della stessa specie (intra-specie).

I geni identificati come marcatori (Fig. 2) e attualmente utilizzati per la definizione del DNA barcode sono il gene COX1 (per materiale animale) e il gene rbcL (per materiale vegetale).

Il gene COX1 (citocromo ossidasi 1) è un gene mitocondriale che codifica la subunità 1 di un complesso enzimatico coinvolto nella catena di trasporto di elettroni nella membrana mitocondriale interna. Il gene rbcL (Rubisco) è un gene del cloroplasto che codifica l'enzima principale della catena di reazioni della sintesi clorofilliana.

Avere identificato questi geni ha consentito di creare un catalogo generale della diversità, di facile accesso per chiunque voglia rapidamente, ma accuratamente, identificare un organismo. Una stretta corrispondenza tra la sequenza di basi del campione e una sequenza nel database identifica rapidamente una specie che è già presente nel database. Codici a barre del tutto nuovi, consentono di immettere nuove specie non ancora descritte.

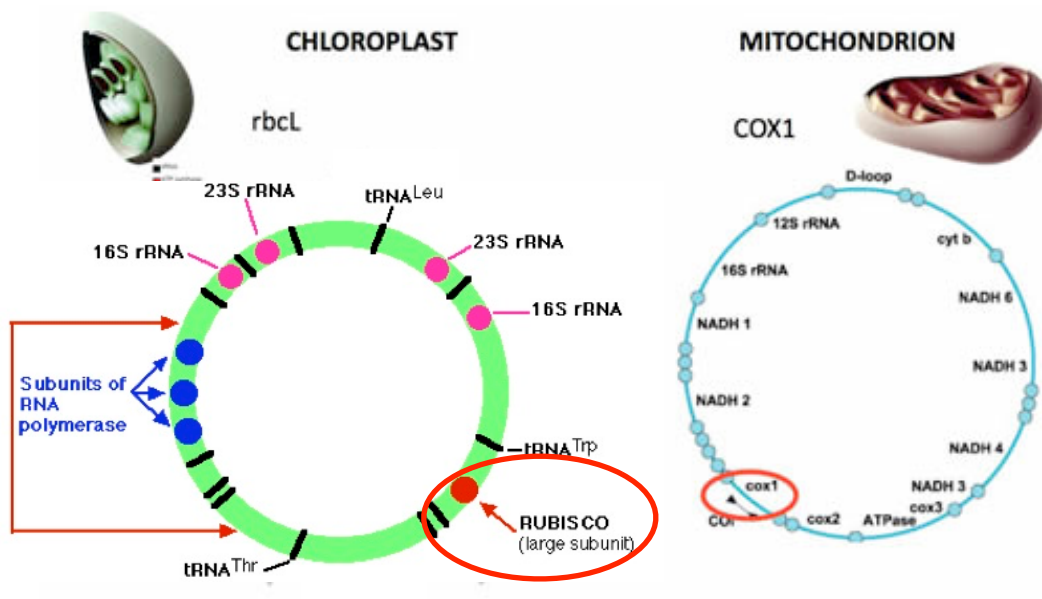


Fig. 2 Genoma del cloroplasto (a sinistra) con in evidenza il gene Rubisco, rbcL, e del mitocondrio (a destra) in evidenza il gene della citocromo ossidasi 1, COX1.

### Possibili ambiti di utilizzo del DNA barcode

Il DNA barcoding costituisce un valido strumento nel lavoro di conservazione della biodiversità, nella diagnosi di patogeni, nel monitoraggio di specie invasive (quelle in grado di colonizzare nuovi ambienti a scapito delle specie native) e in molti altri campi.

Il DNA barcoding è utile per individuare le frodi alimentari in prodotti conservati e molto elaborati, altrimenti non identificabili e per monitorare nei prodotti alimentari la presenza di materiali provenienti da specie protette.

Il DNA barcoding può anche contribuire alla salute pubblica monitorando la presenza di insetti vettori di malattie umane e animali; ad esempio, è stato recentemente utilizzato per distinguere le zanzare vettori di malaria e altre malattie in India.

Nonostante tutti i dati che confermano l'utilità del barcode nella identificazione delle specie animali e vegetali, l'uso del codice a barre del DNA non è ancora stato introdotto e approvato per eseguire i test alimentari in nessun paese del mondo. Alcuni test sono attualmente in fase di studio e di sviluppo, e passeranno alla fase di convalida in tempi brevi. L'utilizzo del codice a barre del DNA per identificare il potenziale rischio biologico tra i prodotti di contrabbando sequestrati dalle dogane è ancora all'inizio.

### Reagenti





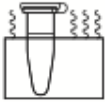
Tampone di Estrazione (NaCl 2M; Tris-HCl 200mM, pH 8.0; EDTA 70mM, pH 8.0; Sodium meta-bisulfite 20mM)
SDS (Sodio Dodecil Solfato) 5%
TE (Tris HCl 10.0 mM-EDTA 1.0 mM pH 8.0)
TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x
Ammonio acetato
Isopropanolo

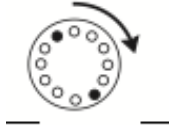
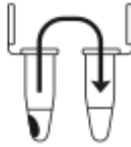
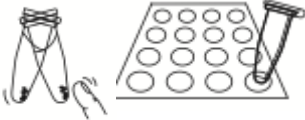



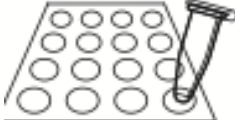

Etanolo 70%
Primers (forward and reverse, 15pmol/ $\mu$ l)
RNAsi enzima
Taq DNA Polymerase enzima 5U/ $\mu$ l
Taq buffer 10x
dNTPs (10mM)
Agarosio
EuroSafe DNA Stain
Loading dye 6x
H <sub>2</sub> O distillata

### Norme di lavoro

- per chi ha i capelli lunghi: legarsi i capelli con un elastico
- prima di cominciare a lavorare, lavarsi le mani
- pulire il banco di lavoro con alcol etilico denaturato
- prima di cominciare l'esperimento, lo studente verrà familiarizzato con la strumentazione che
- dovrà utilizzare, in modo particolare con le micropipette
- indossare i guanti monouso "disposable"

### Protocollo per l'estrazione del DNA genomico da specie vegetale

1) Provate a riconoscere la specie vegetale analizzando il tessuto messo a disposizione (un campione diverso per ciascun studente)	
2) Porre un pezzo di tessuto vegetale, tagliato con le forbici (circa 1-2 cm), in una eppendorf da 1.5ml sulla quale verrà riportato il codice identificativo del campione (e/o del ragazzo/a)	
3) Aggiungere 300 $\mu$ l di Tampone di Estrazione e 100 $\mu$ l di SDS 5%	
4) Macinare bene il tessuto con un pestello	
5) Incubare in termostato alla temperatura di 60°C per circa 30minuti	
6) Preparare dei nuovi tubi eppendorf riportando i codici identificativi	

7) Centrifugare per 15minuti a 13000 giri (rpm, round per minute)	
8) Trasferire 150µl di surnatante in una nuova eppendorf (fare molta attenzione a non aspirare il pellet) e aggiungere 150µl di ammonio acetato 5M e 300µl di isopropanolo	
9) Miscelare per inversione (5 volte) e incubare a temperatura ambiente per 15 minuti	
10) Centrifugare per 5 minuti a 13000 rpm e buttare il surnatante stando attenti che il pellet rimanga attaccato all'eppendorf	
11) Lavare il pellet addizionando 500µl di etanolo 70%	
12) Centrifugare 5 minuti	
13) Buttare il surnatante, scolare bene la provetta facendo attenzione a non perdere il pellet e lasciare asciugare in termostato per 30 minuti	
14) Risospendere il pellet in 50 µl di TE + RNAsi	
Protocollo PCR per DNA vegetale	

Mix PCR per 1 campione di DNA estratto da vegetali	Buffer10x	2,5	
	Primer F (15pmol/ µl)	0,4	
	PrimerR1	0,2	
	PrimerR2	0,2	
	dNTPs(10mM)	0,5	
	H <sub>2</sub> O	18.7	
	DNAestratto	2	
	Taq 5U/µl	0,5	
	<b>Totale</b>	<b>25 µl</b>	
<b>Primer per rbcl</b> F) 5'-TGTAACGACGGCCAGTATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' ( forward primer –rbclafM13) R1) 5'-CAGGAAACAGCTATGACGTAAAATCAAGTCCACCACG-3' (reverse primer–rbclLa-revM13) R2) 5'-CAGGAAACAGCTATGACGTAAAATCAAGTCCACCACG-3' (reverse primer–rbclLa-revM13)			
Condizione PCR	94°C	2 min	} per 35 cicli
	94°C	30 sec	
	54°C	45 sec	
	72°C	45 sec	
	72°C	3 min	
	4°C	end	

## Analisi dei prodotti PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio

### Preparazione del gel di agarosio

La concentrazione di agarosio del gel viene scelta dal ricercatore in base alle dimensioni dei frammenti di DNA da separare. Nel nostro caso, dovendo separare frammenti lineari di DNA compresi tra 550 e 600 bp (base pairs, coppie di basi), si utilizza un gel di agarosio al 2%.

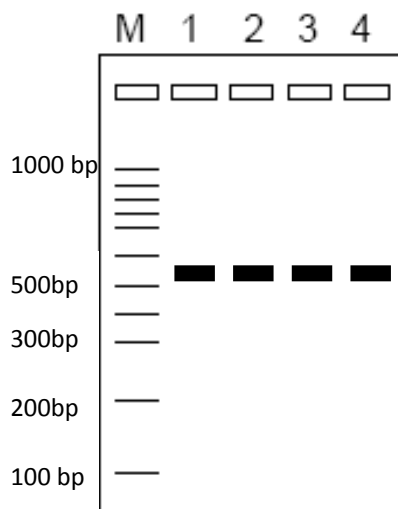
- preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di “nastro adesivo di carta”
- verificare che il piano su cui si appoggia la vaschetta per elettroforesi sia “in bolla”
- misurare 30 ml di tampone TBE 1x in un cilindro e versarli nella beuta di vetro pirex che contiene già 0,6 gr di agarosio.
- pesare la beuta contenente la soluzione di agarosio e segnare il peso
- sciogliere l’agarosio nel forno a microonde. Ogni tanto spegnere e agitare delicatamente la soluzione.
- pesare la soluzione di agarosio e riportarla al peso originale, utilizzando una spruzzetta con H<sub>2</sub>O distillata.
- quando la soluzione si è un po’ raffreddata (riuscite a tenerla in mano) aggiungere 1 µl di Eurosafe.
- versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine.
- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella elettroforetica contenente 250 ml di TBE1x
- togliere lentamente il pettine, tenendosi perpendicolare rispetto al gel

### Corsa elettroforetica

- aggiungere 2  $\mu$ l di loading dye 6x a 10  $\mu$ l di ciascun campione di DNA
- centrifugare brevemente (6 sec)
- caricare lentamente ciascun campione nei singoli pozzetti
- in un pozzetto laterale, caricare il marker di DNA a peso molecolare noto
- chiudere il coperchio della cella elettroforetica
- collegare i morsetti al generatore di corrente, fissare il voltaggio al valore costante di 80 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 30 min
- osservare la migrazione del loading dye per valutare la migrazione del DNA, che, essendo incolore, non si può vedere. Il blu di bromofenolo migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300 bp, mentre lo xilen cianolo migra alla stessa velocità di un frammento di circa 4.000 bp
- alla fine della corsa elettroforetica, osservare il gel sul transilluminatore

### Analisi dei risultati

#### Interpretazione dei risultati della corsa elettroforetica



**M:** marcatore di peso molecolare (100 bp).

**corsia 1,2,3,4:** banda del gene *rbcl* estratto da campione vegetale e amplificato (circa 550bp)



## Attività di Bioinformatica: analisi delle sequenze di DNA ottenute da frammenti vegetali

Durante i 30 minuti di corsa elettroforetica, saranno distribuiti agli studenti alcuni elettroferogrammi (Fig. 3) per imparare ad analizzare i dati ottenuti dal sequenziamento del DNA.

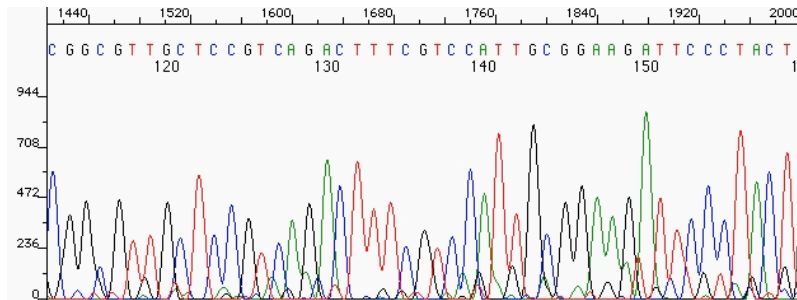


Fig. 3 Elettroferogramma ottenuto dal da sequenziamento del DNA

Le sequenze che saranno analizzate dagli studenti nei laboratori informatici del CusMiBio porteranno all'identificazione di ciascuna specie vegetale da cui è stato estratto il DNA. A tale scopo verra' utilizzata l'interfaccia semplificata ed intuitiva (Fig.4 e 5), appositamente sviluppata dal DNA Learning Center di New York che e' collegata a tutte le banche dati disponibili per tale analisi. Il DNA Learning Center ha autorizzato l'accesso ed utilizzo di questa piattaforma informatica per l'analisi delle sequenze di DNA agli utenti CusMiBio.

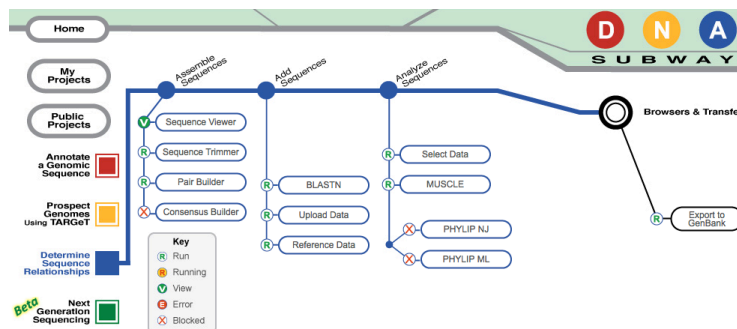


Fig. 4 DNA Subway, piattaforma utilizzata per le analisi delle sequenze di DNA

#	Name	Details	Aln. Length	Bit Score	e	Mis-matches
1.	<input type="checkbox"/> gb JN407321	<b>Morus alba</b> - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	573	1005	0.0	1
2.	<input type="checkbox"/> gb JN407319	<b>Morus alba</b> - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplastgb JN407320.1  Morus alba isolate shawpc0499L ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplastgb KC584883.1  Morus alba ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	573	1005	0.0	1
3.	<input type="checkbox"/> gb DQ226511	<b>Morus indica</b> - genome	573	1005	0.0	1
4.	<input type="checkbox"/> gb U06812.1 MRU06812	<b>Morus rubra</b> - large subunit (rbcL), partial cds; chloroplast gene for chloroplast product	570	1000	0.0	1
5.	<input type="checkbox"/> gb JN114823	<b>Morus alba</b> - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	567	994	0.0	1

Fig. 5 Schermata della banca dati in cui si Individua il nome della specie vegetale