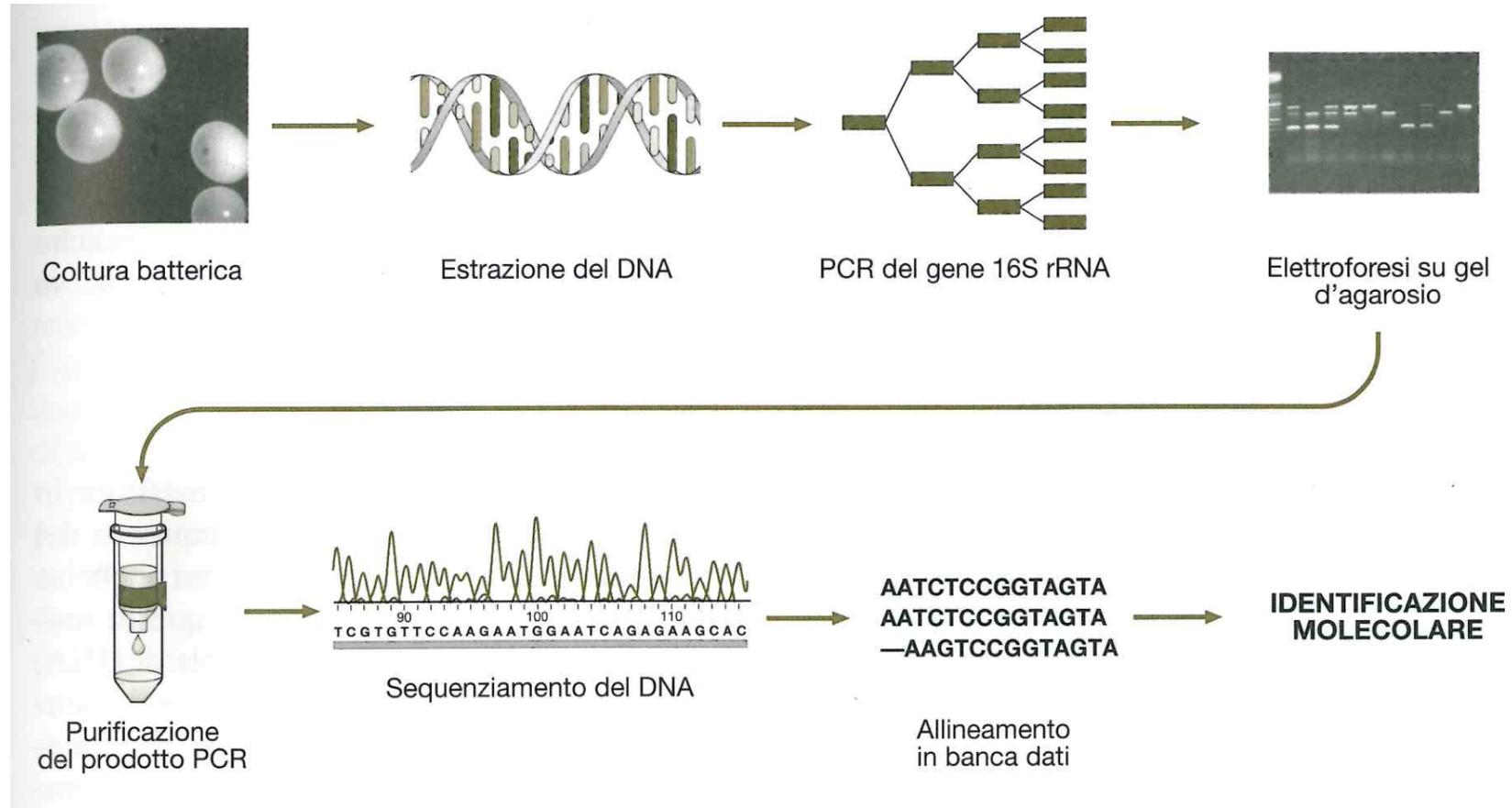
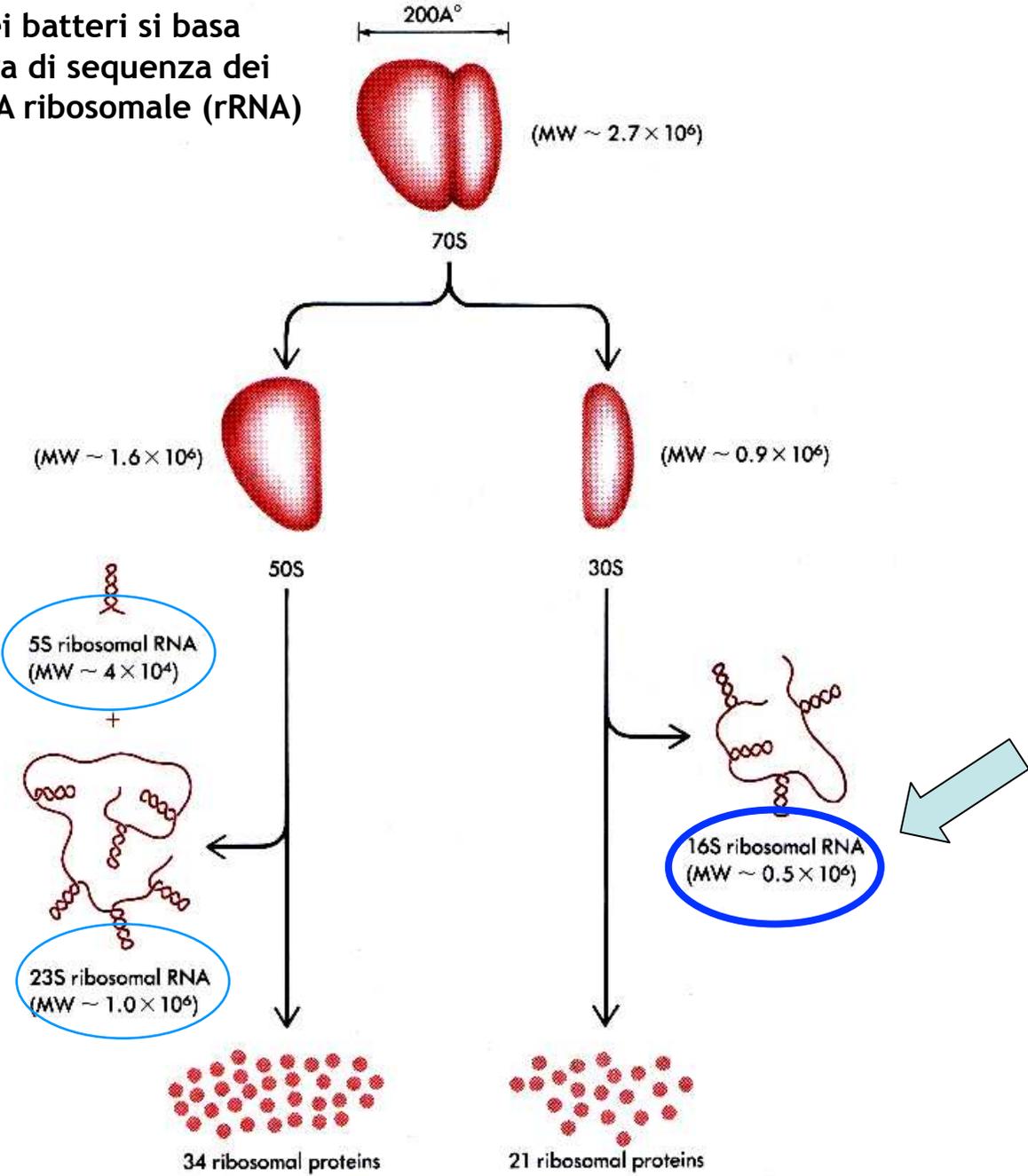


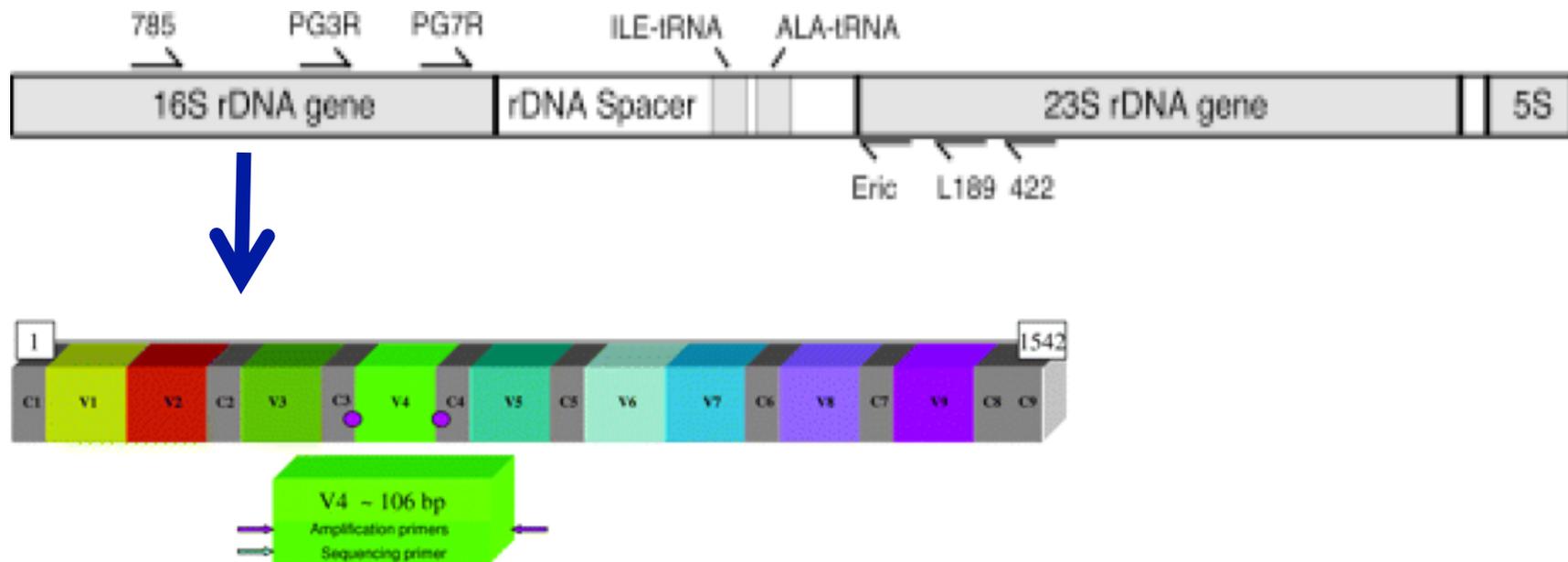
**IDENTIFICAZIONE DEI  
MICRORGANISMI NEGLI  
ALIMENTI**

# IDENTIFICAZIONE SU BASE MOLECOLARE



La classificazione dei batteri si basa sull'analisi comparativa di sequenza dei geni che codificano l'RNA ribosomiale (rRNA)



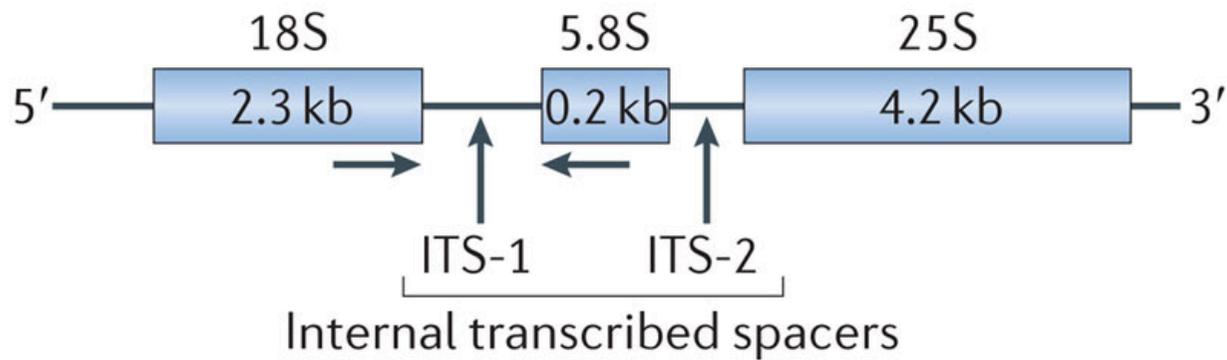


L'rDNA 16S ha una dimensione ragionevole per l'analisi di sequenza (1542 nucleotidi). La presenza sia di domini conservati che variabili fornisce la possibilità di ottenere primers e sonde specifici per le diverse specie batteriche.

La regione spaziatrice intergenica è una regione di DNA non codificante situata tra il gene per l'rRNA 16S e quello per l'rRNA 23S. Questa regione presenta una variabilità di sequenza sufficiente a distinguere ceppi diversi all'interno di una specie.

**Per l'identificazione di specie dei lieviti si utilizza la regione dell' rDNA-ITS (Internal Transcribed Spacer)**

Fungal ribosomal RNA transcribed unit

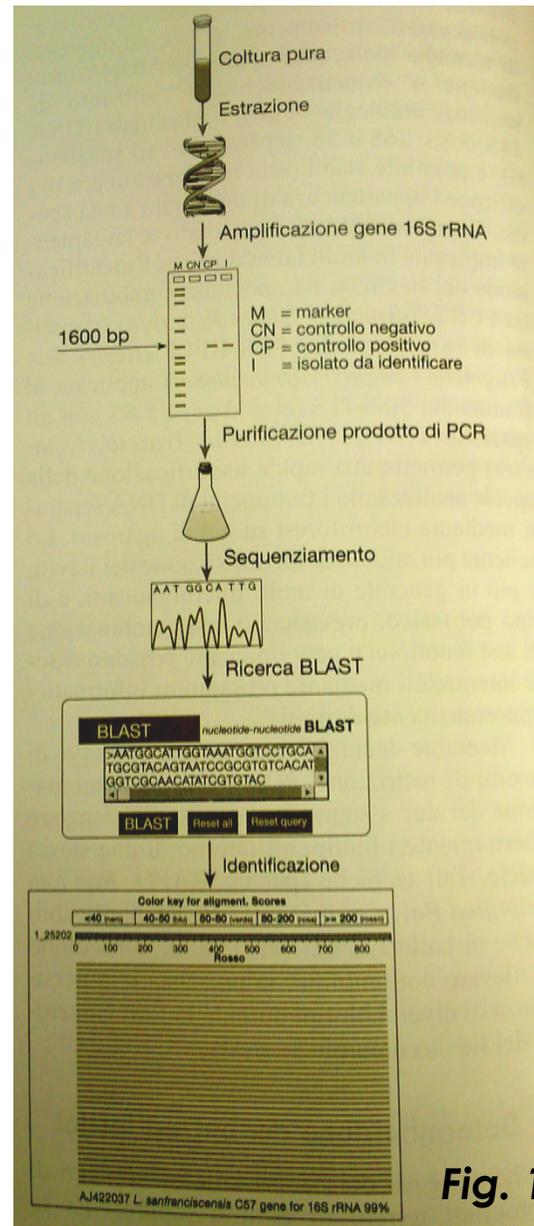


**Nature Reviews | Immunology**

*Nature Reviews Immunology 14, 405–416 (2014)*

# ANALISI DEL 16S AMPLIFICATO

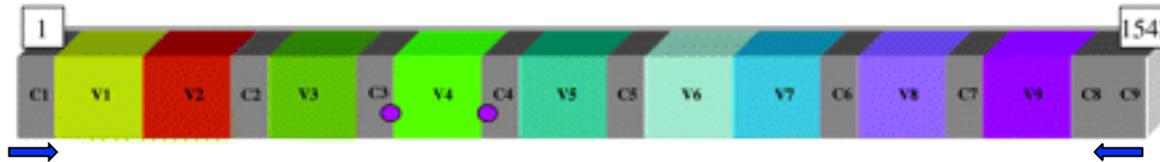
## SEQUENZIAMENTO



IL SEQUENZIAMENTO DEL DNA È  
LA DETERMINAZIONE  
DELL'ORDINE DEI DIVERSI  
NUCLEOTIDI CHE COSTITUISCONO  
L'ACIDO NUCLEICO

Fig. 16.8

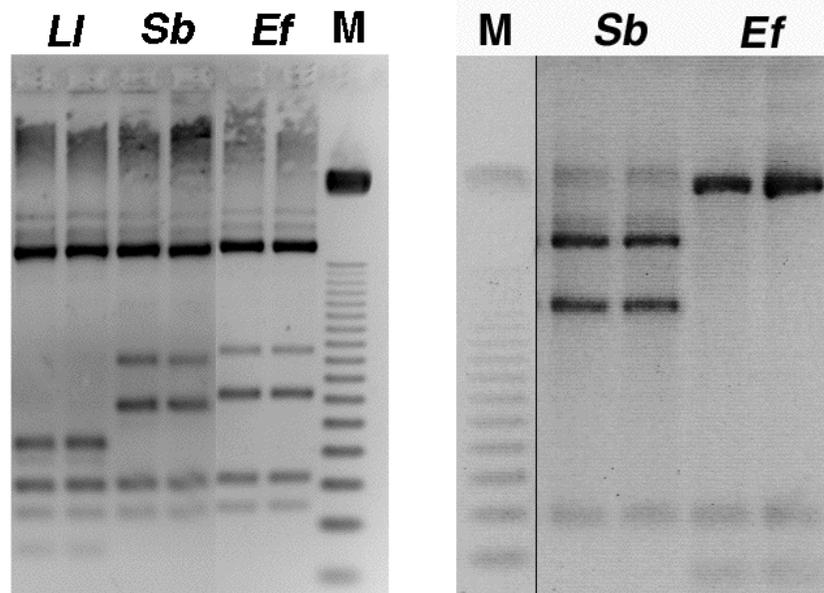
# IDENTIFICAZIONE DI SPECIE CON ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)



Amplificazione per PCR



Digestione dell'amplificato con enzimi di restrizione sintomatici



Separazione dei frammenti su gel di agarosio

Sau3AI

AvaI

*Lactococcus lactis*  
*Streptococcus bovis*  
*Enterococcus faecalis*

# TIPIZZAZIONE MOLECOLARE A LIVELLO DI CEPPO

**Sfrutta la diversità a livello di sequenza del DNA che i MO possiedono anche se appartenenti alla stessa specie**

**Tecniche molecolari di DNA *fingerprinting* che permettono di distinguere diversi biotipi appartenenti ad una specie**

## **PCR fingerprinting**

AP-PCR (arbitrarily primed PCR), 1 primer required, 10-20 bp, no sequence information required

REP-PCR (repetitive extragenic palindromic sequences) 2 primers insert randomly into the REP sites

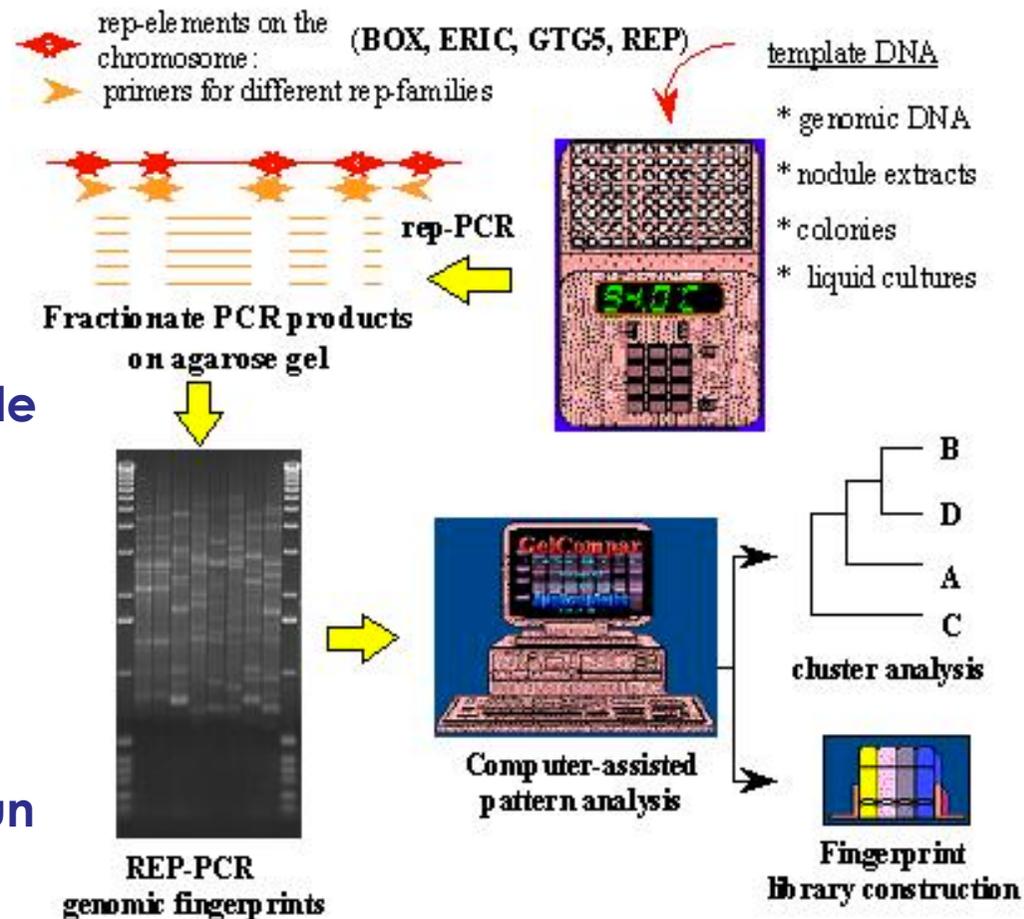
ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences), 2 primers insert randomly into the ERIC sites, best for Gram Negative microbes

All of these fingerprinting techniques tell one if two isolates are the same or different. They do not provide information about the identity or relatedness of the organisms

# TIPIZZAZIONE A LIVELLO DI CEPPO

La Rep-PCR si basa sull'amplificazione di elementi ripetuti di DNA batterico

## The principle of rep-PCR genomic fingerprinting



La numerosità delle bande sarà proporzionale al numero di sequenze ripetute contenute all'interno del genoma di ciascun MO analizzato

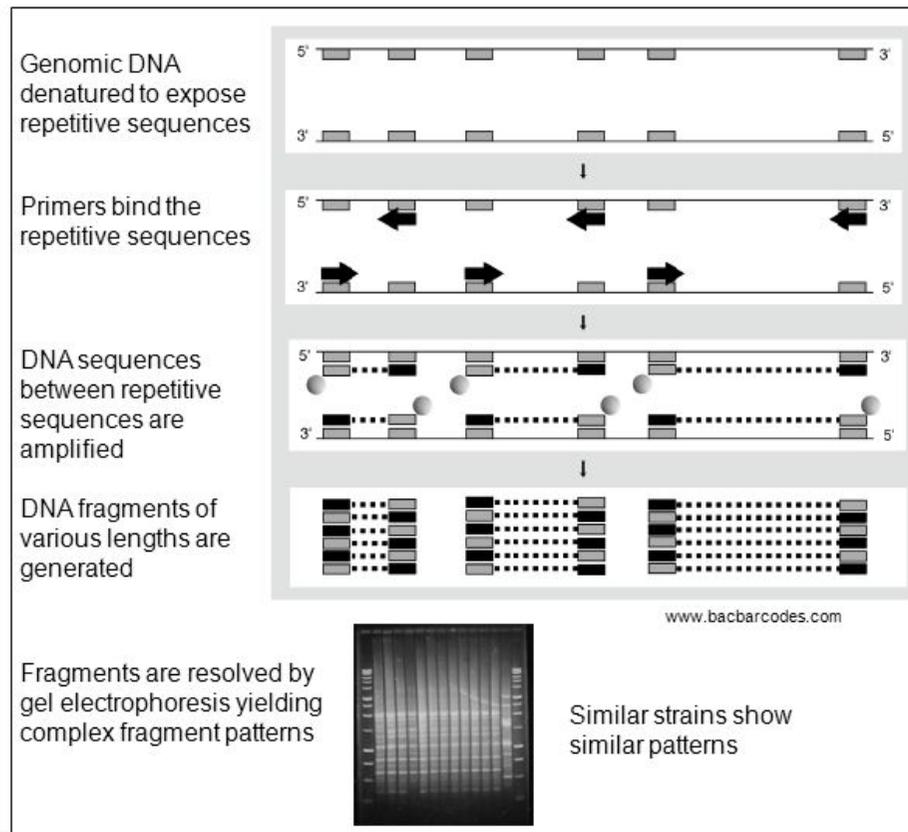
## Repetitive element (REP)-PCR Genomic fingerprinting

16S rRNA analysis = changes in one gene (DNA sequence) at one site in the genome

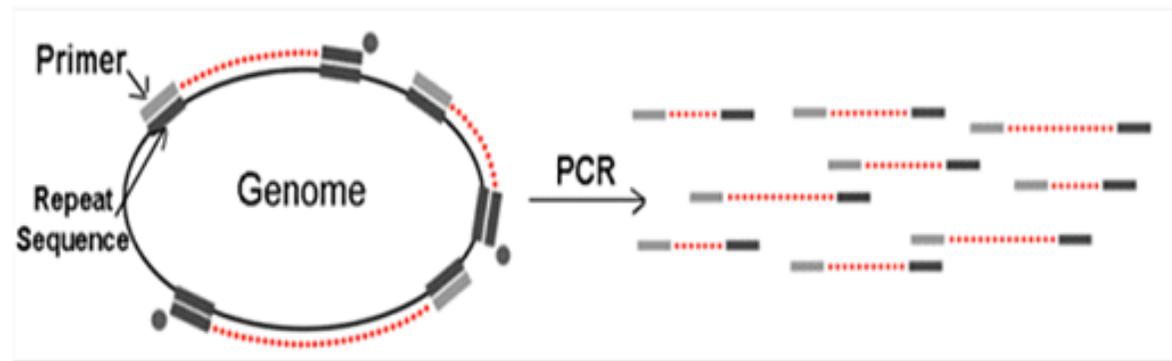
REP = short sequences that occur in multiple locations throughout the bacterial genome

REP-PCR assays variation in sequence at multiple sites throughout the genome

Patterns differentiate bacteria at subspecies level



**Step 1** rep-PCR primers bind to many specific repetitive sequences interspersed throughout the genome. Multiple Fragments of various lengths are amplified.

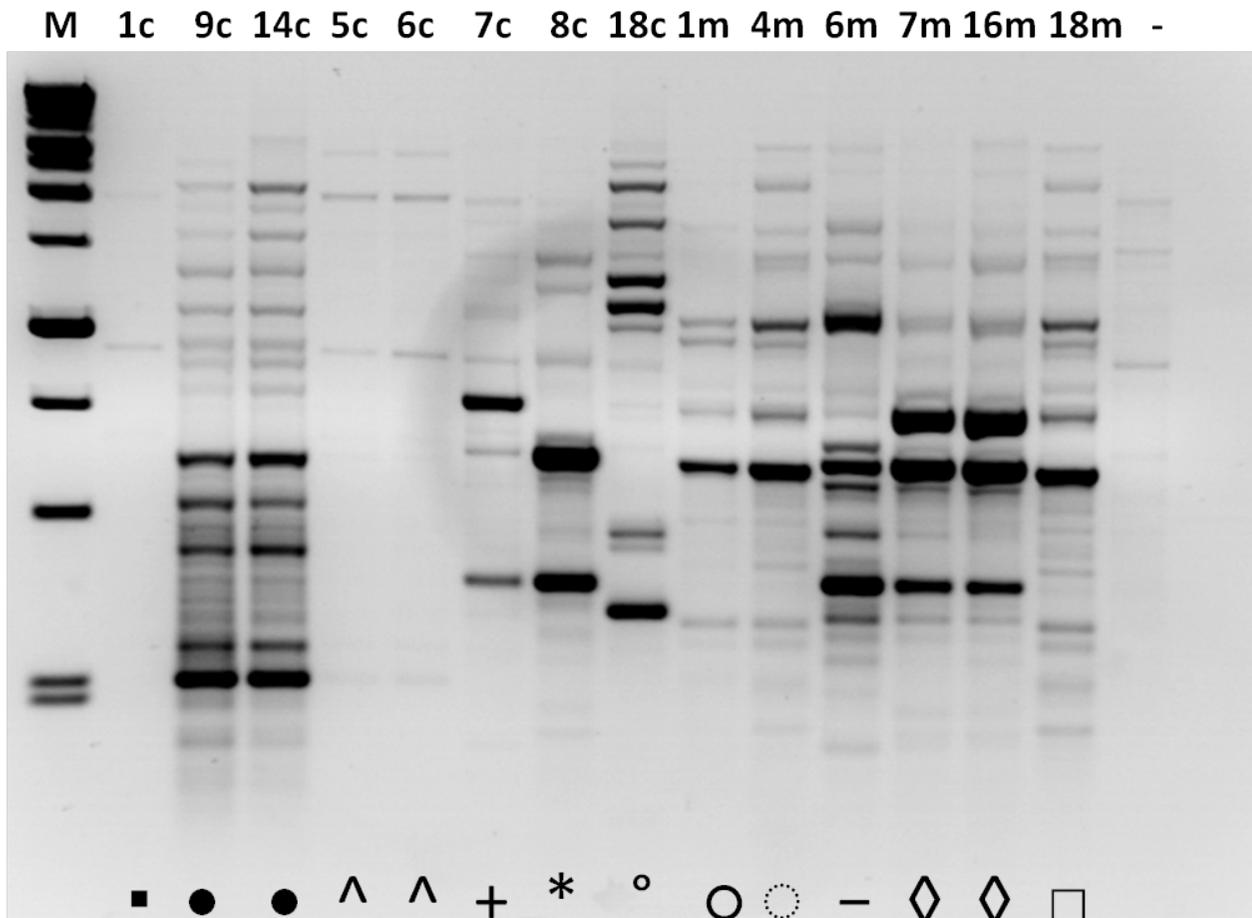


**Step 2** Fragments can be separated by size and charge. A unique rep-PCR fingerprint profile is created containing multiple bands of varying sizes and intensities.



# TIPIZZAZIONE A LIVELLO DI CEPPO

La Rep-PCR si basa sull'amplificazione di elementi ripetuti di DNA batterico



11 profili  
*fingerprinting*  
diversi su 14 isolati  
dimostrano l'elevata  
biodiversità del  
microbiota di un  
prodotto fermentato  
tipico

**METODI COLTURA-INDIPENDENTI:**  
prevedono l'isolamento diretto degli acidi nucleici  
senza passare per la coltivazione dei microrganismi

# COLTURA-DIPENDENTE vs. COLTURA-INDIPENDENTE: DUE APPROCCI A CONFRONTO



*Campione di  
alimento fermentato*

**Selezione di isolati  
mediante coltura su  
terreni specifici**



**SPECIE COLTIVABILI**

**Estrazione del  
DNA totale**



**Biodiversità del microbiota:**  
*Lactobacillus, Enterococcus,  
Lactococcus, Leuconostoc,  
Streptococcus*

**TUTTE LE SPECIE DEL  
MICROBIOTA**

**Costruzione di metagenoteche  
Amplificazione PCR  
Sequenziamento (shotgun; 16S libraries)**

# ESEMPIO DI METODO COLTURA-INDIPENDENTE

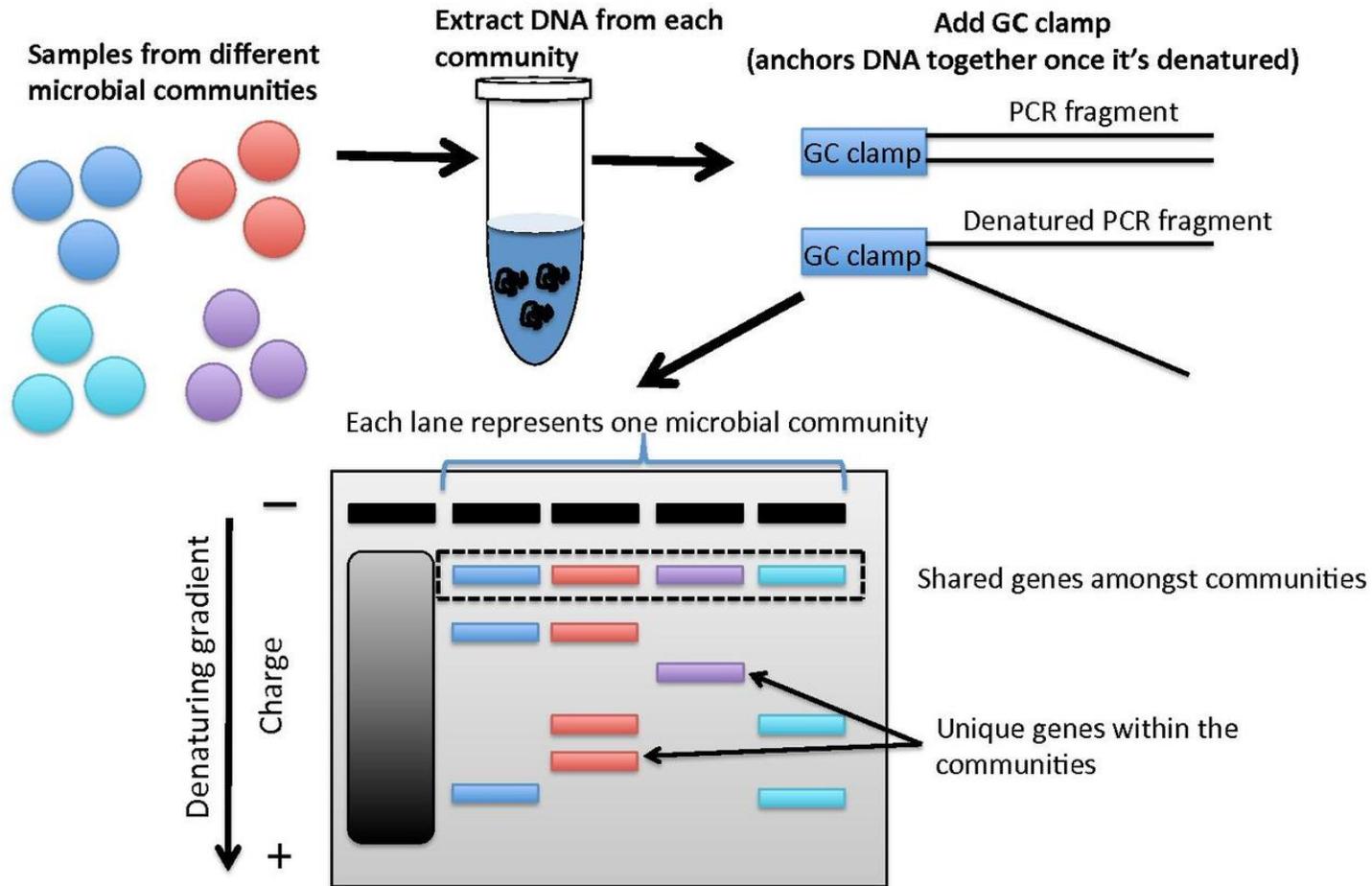
L' elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE) è una tecnica di separazione elettroforetica, ampiamente utilizzata in ecologia microbica degli alimenti, che consente di separare e analizzare frammenti di DNA che differiscono nella sequenza nucleotidica anche di una sola coppia di basi.

Il metodo DGGE è una tecnica elettroforetica per la separazione di frammenti di DNA in base alle loro **differenti proprietà di dissociazione** o "melting".

- Il DNA amplificato, rappresentativo della comunità microbica, è frazionato attraverso un **gradiente denaturante**:
  - Chimico (urea and formamide )
  - Temperatura (TGGE)
- Quando i due filamenti iniziano a dissociarsi si ha una riduzione della velocità di migrazione rispetto alla molecola di DNAs.
- La presenza di "polimorfismi" modifica la proprietà di melting dei diversi DNA
- Le diverse molecole si dissocieranno quindi in punti diversi del gradiente denaturante e saranno distinguibili in base alla diversa migrazione elettroforetica

# ESEMPIO DI METODO COLTURA-INDIPENDENTE

## DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis



La **Metagenomica** è un approccio basato sull'utilizzo di tecniche genomiche moderne per lo studio di comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale, evitando così il problema del prelevamento e coltivazione in laboratorio.

Si basa sul sequenziamento/clonaggio del genoma di microrganismi appartenenti a comunità microbiche complesse, il cui DNA viene isolato direttamente dal proprio habitat naturale. La maggior parte di questi organismi è di difficile coltivazione a causa delle loro particolari esigenze di crescita.

# LA METAGENOMICA IN MICROBIOLOGIA

## INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach

C Manichanh, L Rigottier-Gois, E Bonnaud, K Gloux, E Pelletier, L Frangeul, R Nalin, C Jarrin, P Chardon, P Marteau, J Roca, J Dore



*Gut* 2006;55:205–211. doi: 10.1136/gut.2005.073817

Current Opinion in Microbiology 2007, 10:481–489



ELSEVIER

**Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity**

Vanessa M D'Costa, Emma Griffiths and Gerard D Wright

## Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics

Marco Ventura\*, Sarah O'Flaherty†, Marcus J. Claesson§, Francesca Turroni\*, Todd R. Klaenhammer‡, Douwe van Sinderen§ and Paul W. O'Toole§

NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY

VOLUME 7 | JANUARY 2009 | 61

Current Opinion in Microbiology 2004, 7:492–498



ELSEVIER

**Metagenomics – the key to the uncultured microbes**

Wolfgang R Streit\*<sup>1,2</sup> and Ruth A Schmitz<sup>1</sup>



Full text provided by [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Full text provided by [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

# NEXT GENERATION SEQUENCING

**IL SEQUENZIAMENTO DEL DNA È LA DETERMINAZIONE DELL'ORDINE DEI DIVERSI NUCLEOTIDI CHE COSTITUISCONO L'ACIDO NUCLEICO**

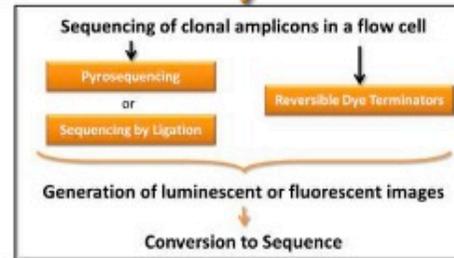
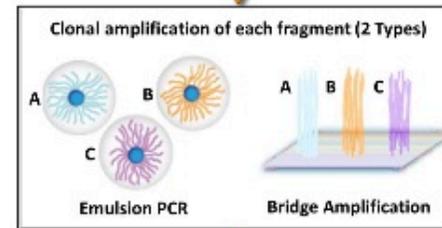
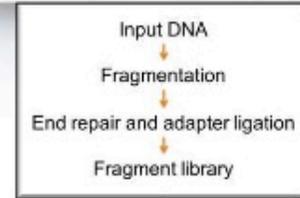
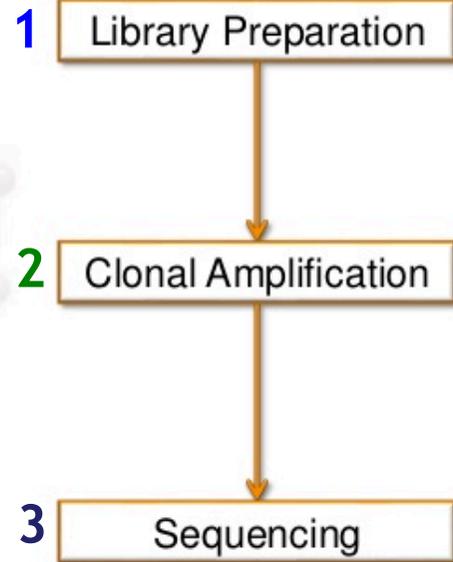


Copyright © 2012 University of Washington

La NGS è anche chiamata high-throughput sequencing (sequenziamento ad alta resa) perchè, a differenza del sequenziamento tradizionale col metodo Sanger, **consente di sequenziare moltissimi frammenti in parallelo**. Esistono diversi sistemi NGS, sviluppati da diverse compagnie. Tutti questi sistemi condividono almeno tre passi fondamentali:

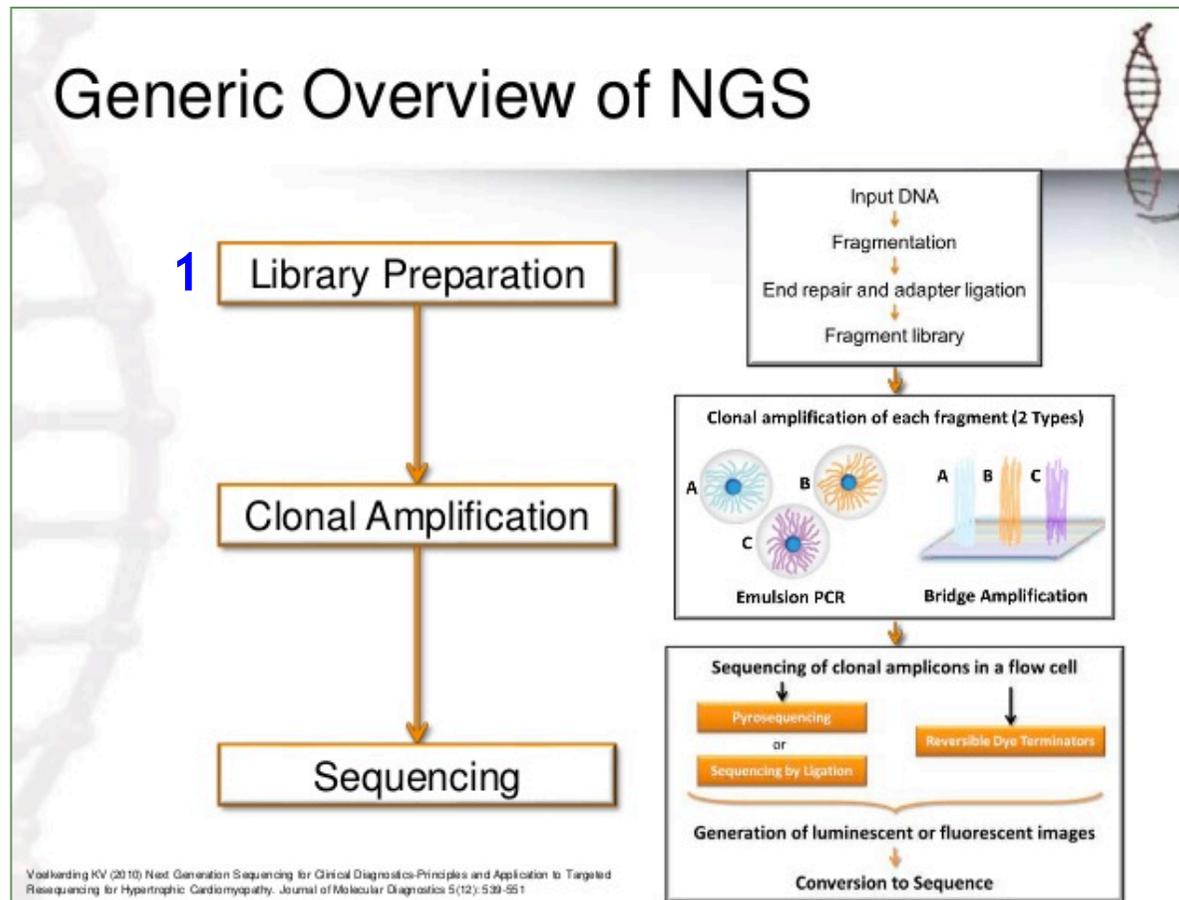
1. Preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta sequencing library)
2. Reazione di amplificazione
3. Reazione di sequenziamento

# Generic Overview of NGS



Volkhard KV (2010) Next Generation Sequencing for Clinical Diagnostics-Principles and Application to Targeted Resequencing for Hypertrophic Cardiomyopathy. Journal of Molecular Diagnostics 5(12): 539-551

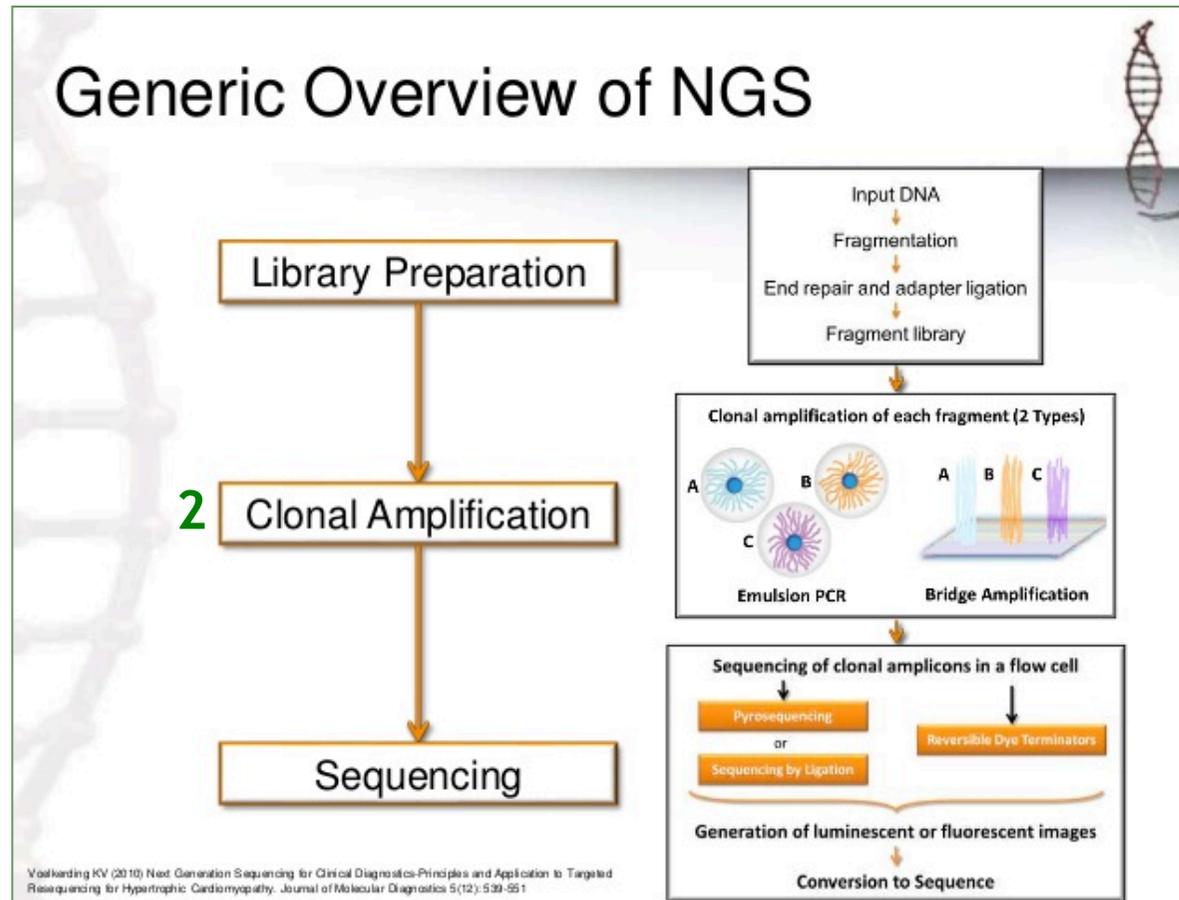
# Generic Overview of NGS



## 1. CREAZIONE DELLA SEQUENCING LIBRARY

Il campione di DNA viene preparato attraverso un processo di frammentazione casuale. Ai frammenti casuali così ottenuti vengono aggiunte delle sequenze predefinite ('adattatori') necessarie per ancorare e immobilizzare i frammenti al supporto sul quale avrà luogo la reazione di sequenziamento. I frammenti di DNA così preparati costituiscono la cosiddetta libreria di sequenziamento (sequencing library)

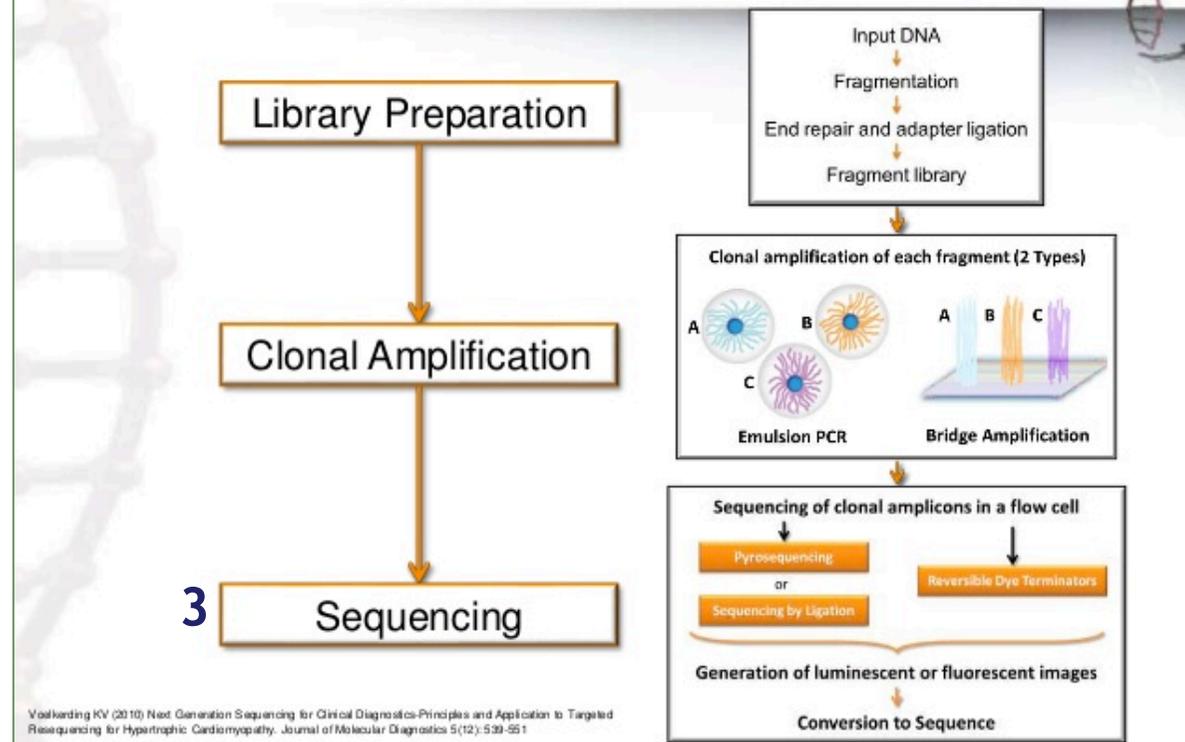
# Generic Overview of NGS



## 2. AMPLIFICAZIONE CLONALE

L'amplificazione può essere fatta in emulsione o in soluzione. Ad esempio, nel sistema GS FLX (Roche) un frammento della sequencing library viene incorporato in una microscopica bolla di acqua assieme a dei cosiddetti enrichment beads, che sono praticamente delle piccole sfere a cui gli adattatori si possono legare. La reazione di amplificazione (PCR) viene fatta in questa microbolla acquosa, all'interno della quale il frammento di DNA viene amplificato numerose volte. Le copie clonali del frammento si legano poi all'enrichment bead ricoprendone la superficie. Gli enrichment beads così ottenuti vengono poi depositati sulla cosiddetta piastra Picotiter.

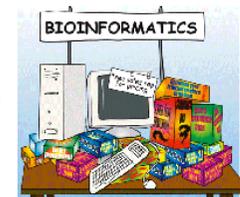
# Generic Overview of NGS

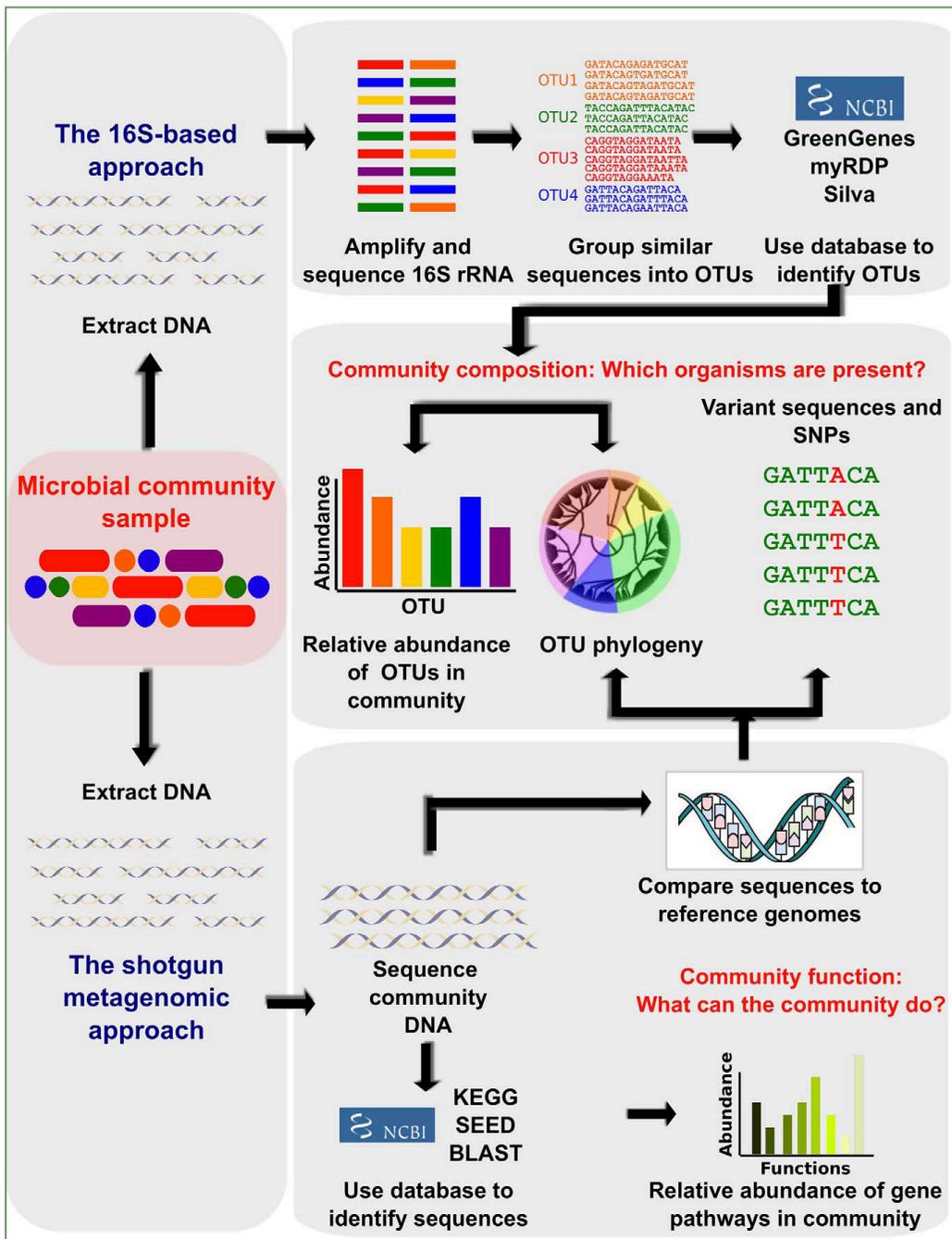


## 3. SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento avviene grazie a complessi meccanismi fluidici che, funzionando su scala microlitrica, regolano il flusso dei reagenti che vanno a cimentarsi col DNA immobilizzato. Ogni ciclo di sequenziamento consiste nel cimentare il DNA immobilizzato con una soluzione contenente un nucleotide (che, se complementare alla sequenza, viene incorporato), un successivo lavaggio e la registrazione dell'evento molecolare appena verificatosi. La registrazione dell'evento molecolare avviene con un sistema per immagini

Una volta completato il sequenziamento, i dati verranno analizzati nella fase computerizzata di **analisi bioinformatica** (alignment, variant calling, filtering and annotation).





OTU (Operational Taxonomic Unit): distinct cluster with significant sequence divergence to any other cluster

Il **sequenziamento shotgun** è il sequenziamento di frammenti random su un campione derivato da un pool di microrganismi.

