FONDAZIONE Diasorin

Costruire una mappa di restrizione del DNA del Fago Lambda

Obiettivo Utilizzare software bioinformatici per identificare numero e dimensione dei frammenti generati dal taglio del DNA del Fago Lambda con gli enzimi di restrizione BamHI e EcoRI, fatti agire singolarmente.

Autore Irene Martina Maina, Fondazione Diasorin



Nessuno





Circa 1 ora e 30 minuti





Collegarsi al sito NCBI Nucleotide (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=</u>) per cercare la sequenza completa del DNA del Fago Lambda nel database di GenBank[®]: scrivere nella banda di ricerca "Phage Lambda" e cliccare su "Search" (riquadro rosso).

NIH National Library	of Medicine	Log in
Nucleotide	Phage Lambda Advanced	Search Help
ACCCAGCACACAT TGTAGCTTACCACAC	TATT The Nucleotide database is a collection of PDB. Genome, gene and transcript seque	of sequences from several sources, including GenBank, RefSeq, TPA and ence data provide the foundation for biomedical research and discovery.
Using Nucleotide	Nucleotide Tools	Other Resources
Quick Start Guide	Submit to GenBank	GenBank Home
FAQ	LinkOut	RefSeq Home
Help	<u>E-Utilities</u>	Gene Home
GenBank FTP	BLAST	SRA Home
RefSeq FTP	Batch Entrez	INSDC

 Appare una schermata in cui sono elencate varie sequenze del DNA del Fago Lambda con diverse caratteristiche: scegliere l'opzione 1 denominata "Enterobacteria phage lambda, complete genome" (riquadro rosso).

	al Library of Medicine anter for Biotechnology Information	[Log in]
Nucleotide	Nucleotide Phage Lambda Create alert Advanced	Search Help
Species Animals (136)	Summary + 20 per page + Sort by Default order + Send to: +	Filters: <u>Manage Filters</u>
Plants (14) Fungi (5)	Items: 1 to 20 of 12034	Results by taxon
Protists (3) Bacteria (10,760) Viruses (892) Customize Molecule types genomic DNA/RNA (11,680) mRNA (88) Customice	<< First < Prev Page 1 of 602 Next> Last>> C Enterobacteria phage lambda, complete genome 1. 48,502 bp linear DNA Accession: NC_001416.1 GI: 9626243 Assembly BioProject Protein PubMed Taxonomy GenBank FASTA Graphics	Top Organisms [Tree] Salmonella enterica (3290) Escherichia coli (3040) Klebsiella pneumoniae (1295) Lambdavirus lambda (518) Enterobacter hormaechei (344) All other taxa (3547) More
Source databases INSDC (GenBank) (11,739) RefSeq (168) Customize Sequence Type Nucleotite (12,023)	Escherichia phage Lambda, complete genome 2. 48,502 bp linear DNA Accession: J02459.1 Gl: 215104 Assembly Protein PubMed Taxonomy GenBank FASTA Graphics	Find related data Database: Select Find items
EST (11)	Escherichia phage Lambda isolate P9/2022/SA, partial genome 3. 3 374 bp linear DNA	Search details
Genetic compartments Plasmid (16)	Accession: OR9/4325.1 GI: 2647417184 Protein Taxonomy GenBank FASTA Graphics	"Escherichia phage Lambda"[Organism] OR Phage Lambda[All Fields]



3. Nella schermata successiva sono riassunte alcune caratteristiche della sequenza del DNA del Fago Lambda, come la lunghezza in paia di basi (48.502 pb), la conformazione del DNA (lineare) e l'ospite da cui il DNA è stato estratto (*Escherichia coli*). A seguire è riportata una lunga serie di referenze con indicazione di autore, titolo e rivista scientifica dell'articolo su cui è stato pubblicato lo studio associato al genoma cercato.

NIH National Library of Medicine			Log in
Nucleotide Nucleotide Advanced		Search	Help
GenBank + Se	end to: 🗸	Change region shown	
Enterobacteria phage lambda, complete genome		Customize view	•
		Analyze this sequence Run BLAST	
LOCUS NC_001416 48502 bp DNA linear PHG 11-JAN-2023 DEFINITION Enterobacteria phage lambda, complete genome. ACCESSION NC_001416		Pick Primers Highlight Sequence Features	
VENSION NE_OPIALOI DBLINK BioProject: <u>PRJNA485481</u> KEYWORDS RefSeq.		Find in this Sequence	
ORGANISM <u>Escherichia phage Lambda</u> Viruses; Duplodnaviria; Heunggongvirae; Uroviricota; Caudoviricetes; Lambdavirus; Lambdavirus lambda.		Related information Assembly	
REFERENCE 1 (sites) AUTHORS Chen,C.Y. and Richardson,J.P. TITLE Sequence elements essential for rho-dependent transcription		BioProject Protein	
termination at lambda tR1 JOURNAL J. Biol. Chem. 262 (23), 11292-11299 (1987) PUBMED <u>3038914</u>		PubMed Taxonomy	
REFERENCE 2 (sites) AUTHORS Peltz.S.W., Brown,A.L., Hasan,N., Podhajska,A.J. and Szybalski,W. TITLE Thermosensitivity of a DNA recognition site: activity of a		Full text in PMC Gene	
truncated nutL antiterminator of coliphage lambda JOURNAL Science 228 (4695), 91-93 (1985) PUBMED <u>3156406</u> BFEFERVCF 3 (sites)		Identical GenBank Sequence Mature Peptides	
AUTHORS Coleclough,C. and Erlitz,F.L. TITLE Use of primer-restriction-end adapters in a novel cDNA cloning strategy		Other INSDC Genome Sequence PubMed (Weighted)	S

Alla fine della lista di referenze scientifiche, sono presentati i geni che costituiscono il DNA del Fago Lambda e le proteine che questi geni codificano. Nell'immagine sotto riportata come esempio si evince che i nucleotidi in posizione 191...736 (pb) costituiscono il gene denominato "nul" e che la CDS, ovvero la sequenza codificante di questo gene (inizio a 191 pb e fine a 736 pb) porta le informazioni per la proteina "terminase small subunit". Nell'ultimo riquadro rosso è evidenziata la sequenza amminoacidica della proteina corrispondente.



FEATURES	Location/Qualifiers
source	148502
	/organism="Escherichia phage Lambda"
	/mol_type="genomic DNA"
	/host="Escherichia coli"
	/db_xref="taxon: <u>2681611</u> "
gene	191736
	/gene="nu1"
	/locus_tag="lambdap01"
	/db_xref="GeneID: <u>2703523</u> "
CDS	191736
	/gene="nu1"
	/locus_tag="lambdap01"
	/codon_start=1
	/transl_table= <u>11</u>
	<pre>/product="terminase small subunit"</pre>
	/protein_id=" <u>NP_040580.1</u> "
	/db_xref="GeneID: <u>2703523</u> "
	/translation="MEVNKKQLADIFGASIRTIQNWQEQGMPVLRGGGKGNEVLYDSA
	AVIKWYAERDAEIENEKLRREVEELRQASEADLQPGTIEYERHRLTRAQADAQELKNA
	RDSAEVVETAFCTFVLSRIAGEIASILDGLPLSVQRRFPELENRHVDFLKRDIIKAMN
	KAAALDELIPGLLSEYIEQSG"

La pagina continua con un lungo elenco di geni, fino a quando si giunge alla sequenza nucleotidica del DNA del Fago Lambda. Ulteriori dettagli sulle informazioni riportate in questa pagina sono reperibili nelle note.

4. Per ottenere la sequenza del DNA del Fago Lambda in formato FASTA, tornare all'inizio della pagina e cliccare su "FASTA" (riquadro rosso). Maggiori informazioni sul formato FASTA sono disponibili nelle note.

NIH	National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information			Log in
Nucleotide	e Nucleotide v Advanced		Search	Help
GenBank 🗸		Send to: 👻	Change region shown	
Enterot	pacteria phage lambda, complete genome ence Sequence: NC_001416.1		Customize view	•
<u>Go to:</u> ♥	Mures		Analyze this sequence Run BLAST	
LOCUS	NC_001416 48502 bp DNA linear PHG 11-JAN-2023		Pick Primers	
DEFINITION	Enterobacteria phage lambda, complete genome. NC 001416		Highlight Sequence Features	
VERSION	NC_001416.1		Find in this Sequence	
DBLINK	BioProject: <u>PRJNA485481</u>			
SOURCE	Escherichia phage Lambda			
ORGANISM	<u>Escherichia phage Lambda</u> Viruses; Duplodnaviria; Heunggongvirae; Uroviricota; Caudoviricetes; Lambdavirus; Lambdavirus lambda.		Related information Assembly	



 Copiare la sequenza completa del DNA del Fago Lambda, a partire dalla riga identificata dalla freccia rossa.

NIH National Library of Medicine		Log in
Nucleotide Nucleotide Advanced	Search	Help
FASTA -	Send to: - Change region show	n 💌
Enterobacteria phage lambda, complete genome	Customize view	
NCBI Reference Sequence: NC 001416.1	Customize view	
GenBank Graphics		
NC 001416 1 Estenshastonia phage lambda, complete genere	Analyze this sequence	e 🧧
- GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	Pun BLAST	-
TCATAACTTAATGTTTTTATTTAAAATACCCTCTGAAAAGAAAG	Kui beksi	
TTTTTGGCCTCTGTCGTTTCCTTTTCTCTGTTTTTGTCCGTGGAATGAACAATGGAAGTCAACAAAAAGCA	Pick Primers	
GCTGGCTGACATTTTCGGTGCGAGTATCCGTACCATTCAGAACTGGCAGGAACAGGGAATGCCCGTTCTG		
CGAGGCGGTGGCAAGGGTAATGAGGTGCTTTATGACTCTGCCGCCGTCATAAAATGGTATGCCGAAAGGG		
ATGCTGAAATTGAGAACGAAAAGCTGCGCCGGGAGGTTGAAGAACTGCGGCAGGCCAGCGAGGCAGATCT	Related information	(
CCAGCCAGGAACTATTGAGTACGAACGCCATCGACTTACGCGTGCGCAGGCCGACGCACAGGAACTGAAG	Assembly	
TGTTGATTTCCTGAAACGGGATATCATCAAAGCCATGAACAAAGCCAGCC	BioProject	
GGGTTGCTGAGTGAATATATCGAACAGTCAGGTTAACAGGCTGCGGCATTTTGTCCGCGCCGGGCTTCGC	Protein	
TCACTGTTCAGGCCGGAGCCACAGACCGCCGTTGAATGGGCGGATGCTAATTACTATCTCCCGAAAGAAT		
CCGCATACCAGGAAGGGCGCTGGGAAACACTGCCCTTTCAGCGGGCCATCATGAATGCGATGGGCAGCGA	PubMed	
CTACATCCGTGAGGTGAATGTGGTGAAGTCTGCCCGTGTCGGTTATTCCAAAATGCTGCTGGGTGTTTAT	Taxonomy	
GCCTACTTTATAGAGCATAAGCAGCGCAACACCCTTATCTGGTTGCCGACGGATGGTGATGCCGAGAACT		
TTATGAAAACCCACGTTGAGCCGACTATTCGTGATATTCCGTCGCTGCTGGCGCTGGCCCCGTGGTATGG	Full text in PMC	
	Gene	
AAAGTCCATCCGTGGCTCCACGCCAAAAGTGAGAGGCACCTGTCAGAGTGCAGCGTGCAGCCAGTGAAACC	Identical GenBank Sequ	ence
CCGCATTTTATGCGTTTTCATGTTGCCTGCCCGCATTGCGGGGAGGAGCAGTATCTTAAATTTGGCGACA	Mature Peptides	

 Collegarsi al sito NEBcutter (<u>https://nc3.neb.com/NEBcutter/</u>), sviluppato da New England BioLabs, per identificare i siti di taglio degli enzimi di restrizione BamHI e EcoRI sulla sequenza del DNA del Fago Lambda.

NEBcutte	۲ [®]	be INSPIRED BioLabs*me.
v3.0.19	WELCOME GUES	T, SIGN IN OR SIGN UP 💬 FEEDBACK ? HELP
Open Recent Project Projects will be automatically deleted 7 day(s) after they were last accessed.	Enter a DNA sequence, or select from other options, to identify cut sites. Once you submit a sequence, yo choose to customize your digest.	u may
	Text File GenBank Plasmid Vector Viral & Phage	
Disable cookies	Type or paste sequence	k
	Looking for NEBcutter v2? It's still available at https://nc2.neb.com, but is no longer being updat	ed.
	ABOUT THIS TOOL HISTORY RALL TOOLS TECH SUPPORT NEB Overview Site Map Trademarks Legal and Disclaimers Privacy Cookie Policy Terms © Copyright 2025 New England Biolabs. All Rights Reserved.	s of Use



7. Incollare nell'apposito riquadro la sequenza FASTA del DNA del Fago Lambda, precedentemente copiata.

NEBcutte	er [®]					B	NEW ENGLAND BioLabs Inc. be INS drive DIS stay GE
v3.0.19	_				WELC	COME GUEST, SIGN IN OR SIGN UP	─ FEEDBACK ? H
Open Recent Project	Enter a DNA sec choose to custo	quence, or s mize your di	elect from other o gest.	ptions, to identify cut site	s. Once you submit a s	equence, you may	
Projects will be automatically deleted 7 day(s) after they were last accessed.	1. Input o	r choos	se sequend	ce. 🛛			
	Text	File	GenBank	Plasmid Vector	Viral & Phage		
	2. Set pre	Additiona	I Preferences (enzy	TGCTTTATGACTCTGC CGCCGGGAGGTTGAA	CGCCGTCATAAAATGC GAACTGCGGCAGGCC GAACTGCGGCAGGCC	SAATGCCGATCTG STATGCCGAAAGGG CAGCGAGGCAGATCT	
	3. Name Enter proje	project	(optional).	0			
	Submit						

8. Impostare le preferenze desiderate, cliccando su "Additional Preferences (enzymes, oligos, etc)" (freccia dell'immagine al punto 7): viene caricata una schermata in cui è possibile inserire gli enzimi di restrizione di interesse e le loro sequenze di taglio. Nell'immagine sotto riportata, è stato chiesto al programma di trovare nel DNA del Fago Lambda i siti di taglio degli enzimi BamHI e EcoRI, riportando a tal proposito la sequenza da loro riconosciuta. Aiutarsi con i simboli dei punti interrogativi per conoscere come scrivere la sequenza di taglio e la tipologia dell'enzima di restrizione. Salvare le preferenze, cliccando sul riquadro arancione (freccia).



Additional	Preferences		×
Enzymes Supplier: () NEB enzymes only All commercially ava All enzymes, includir Oligonucleotide seque None Enzymes selected & below Only oligonucleotide Name (optional)	ailable enzymes ng non-commercially available ences to include: ? a oligonucleotide sequences defined e sequences defined below Sequence ?	Enzymes to include: () Type I Type II Homing endonucleases Nicking enzymes Methylation sensitivities to include: () CpG Dam Dom	Process this region only: Dep Dep Dep Dep Dep Dep Dep Dep Dep Dep
BamHI EcoRI + Save Preference	G^GATC_C G^AATT_C Cancel		

 Tornati alla pagina principale, non spuntare l'indicazione "circular", dal momento che il DNA del Fago Lambda è lineare, inserire un nome al progetto (opzionale) e cliccare su "submit" (freccia).

NEBcutte	
v3.0.19 Open Recent Project Projects will be automatically deleted 7 day(s) after they were last accessed.	WELCOME GUEST, SIGN IN OR SIGN UP () FEEDBACK ? HELP Enter a DNA sequence, or select from other options, to identify cut sites. Once you submit a sequence, you may choose to customize your digest. 1. Input or choose sequence.
	Text File GenBank Plasmid Vector Viral & Phage
	TCATAACTTAATGTTTTATTTAAATACCCTCTGAAAGGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGGC TTTTTGGCCTGTGGTTTTATTTAATAATACCCTCTGAAAGGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGGC TTTTTGGCCTGGTGCGTTTTCTGTGTTTTGCCGTGGGAATGAACAATGGAAGTCAACAAAAAGCA GCTGGCTGACATTTTCGGTGCGAGTGCACATTCAGAACTGGCAGGAAGCACAGGGAATGCCCGTTCTG CGAGGCGGTGGCAAGGGTAACGGGGCTTTATGACTCTGCCGCCGCGTCATAAAATGGAAGGCAGGGCAGGCGAGGCAAGAAAAGCTGCCGGGAAGGCTTGAAGAACTGCCGGCAGGCCAGCGAAGGCAGAGTCT CCAGCCAGGAACTGCGGCAGGGCGCACGGCAGGCCGACGGCAGGCCAGCGAAGGCAGATCT CCAGCCAGGAACTATTGAGTACGAACGCCATCGACTTACGCGTGCGCAGGCCGACGCGACGGCACAGGAACTGAAG AATGCCAGAGAACTGCCGCTGAAGTGGTGGGAAACCGCATTCTGTACTTTCGTGCTGTCGCGGAACGGAAGTGG 2 Set preferences 0
	Circular Additional Preferences (enzymes, oligos, etc)
	3. Name project (optional). DNA Fago Lambda_BamHI_EcoRI



10. Il programma elabora la richiesta e, cliccando su "Enzyme List" (evidenziato in arancione), viene riportato il numero dei siti di taglio (indicati come "Cuts" nell'immagine) che i due enzimi di restrizione riconoscono nella sequenza del DNA del Fago Lamba: 5 per la digestione operata da BamHI e 5 da EcoRI.

V3.0.19 Create New Project	® DNA Fago Lamb	oda_Ec	WELC	OME GUEST, SIGN IN OR SIGN	NEW ENGLAND BIOLADS IN. INSTRED down DISCOVERY AND GRUINE IUP FEEDBACK ? HELP
Graphical View	Supplier 😧	(Cutters 😧		NEB Restriction Enzyme Activity/Performance Chart
Sequence	Not commercially availa	ble	n cutters min 1 – 1 max 0 cutters		
ORF Summary	Enzyme ^	Cuts \land	Recognition Sequence	Methy	ylation Sensitivity?
Flanking Sites	▶ BamHI	5	G [*] GATC_C	CpG,E	Dam
Custom Digest	EcoRI	5	G AATT_C	СрG	

 Cliccando sulle frecce, posizionate vicino ai nomi degli enzimi di restrizione, vengono mostrate le posizioni (riquadri rossi) in cui BamHI e EcoRI agiscono tagliando il DNA del Fago Lambda.

NEBcutter [®]						6	K new england BioLabs	be INSPIRED drive DISCOVEI ne. ялу GENUINE
v3.0.19				WELC	OME GUEST, <mark>SIC</mark>	ON IN OR SIGN UP	FEEDBA	CK ? HELP
Create New Project	DNA Fago L	ambda_E	coRI_BamHI					
Graphical View	Supplier 😧		Cutters 😧			Œ	NEB Restric	tion Enzyme
Enzyme List	 NEB Other supplier Not commercially 	v available	All enzymes	1 max			☐ Activity/Per	ormance Char
Sequence			_ o cullers					
ORF Summary	Enzyme	∧ Cuts ∧	Recognition Sequence			Methyla	tion Sensitivit	y?
Flanking Sites	BamHI	5	G [*] GATC_C			CpG,Dan	1	
Custom Digest	Cut Position	Site with Flan	ks (5′ → 3′)	CpG	Dam	Dcm	EcoBl	EcoKI
oustoin bigest	5505/5509	5495 CGCATTAT	GG G [*] GATC_C TCAACTGTGA	No overlap	Not tested	No overlap	No overlap	No overlap
	22346/22350	22336 AAACTGT	TCC G GATC C GGGAGGCGGA	Not tested	Not tested	No overlap	No overlap	No overlap
Results For: 2 Edit	27972/27976	27962 AAAGGTA	GGC G GATC C CCTTCGAAGG	Not tested	Not tested	No overlap	No overlap	No overlap
Oligos:	34499/34503	34489 GTATAGA	AAT G'GATC C ACTCGTTATT	No overlap	Not tested	No overlap	No overlap	No overlap
- G^AATT_C	41732/41736	41722 GGTCATC	ACG G GATC C CATGTGCGTG	No overlap	Not tested	No overlap	No overlap	No overlap
ORFs:	▼ EcoRI	5	G AATT C			CpG		
- Searched	Cut Position ^	Site with Flan	ks (5′ → 3′)	CpG	Dam	Dcm	EcoBl	EcoKI
Sequence Information: 😧	21226/21230	21216 6660066	TEA GATT C SECUTIONS	Not tested	No overlap	No overlap	No overlap	No overlap
18502 bp, Linear	26104/26108	26094 ATGCTGA		No overlap	No overlap	No overlap	No overlap	No overlap
GC = 50%, AT = 50%	31747/31751	31737 CGCCGGA		No overlap	No overlap	No overlap	No overlap	No overlap
Analysis Warnings: 🛆	39168/39172	39158 ATTCGTC	AGA G AATT C TGGCGAATCC	No overlap	No overlap	No overlap	No overlap	No overlap
Too many sites	44972/44976	44962 TGTCTGT		No overlap	No overlap	No overlap	No overlap	No overlap
View details		The function		.to overlap	rie erenap	no ovenup	no oronap	ris svenup



12. Sulla base delle informazioni ottenute è possibile costruire la mappa di restrizione degli enzimi BamHI e EcoRI, identificando numero e dimensioni dei frammenti che si generano dalla loro azione sul DNA del Fago Lambda. Nell'immagine sottostante il DNA del Fago Lambda è indicato come una linea colorata: nella parte superiore della linea sono evidenziate le posizioni di taglio dell'enzima di restrizione in esame, mentre in quella inferiore la lunghezza dei frammenti generati.

BamHI



EcoRI



I dati ricavati dalla ricostruzione delle mappe di restrizione possono essere riassunti nelle tabelle sottostanti:

DNA FAGO LAMBDA DIGERITO CON BamHI		DNA FAGO LAMBDA DIGERITO CON EcoRI	
NUMERO FRAMMENTI	DIMENSIONE FRAMMENTI	NUMERO FRAMMENTI	DIMENSIONE FRAMMENTI
1	5.505 pb	1	21.226 pb
2	16.841 pb	2	4.878 pb
3	5.626 pb	3	5.643 pb
4	6.527 pb	4	7.421 pb
5	7.233 pb	5	5.804 pb
6	6.770 pb	6	3.530 pb



13. Testare in laboratorio le informazioni ricavate dall'analisi bioinformatica, facendo digerire in vitro il DNA del Fago Lambda con gli enzimi BamHI e EcoRI e visualizzando i frammenti ottenuti con corsa elettroforetica su gel d'agarosio, come spiegato nel protocollo "Digestione enzimatica del DNA del Fago Lambda" (sezione: Biotecnologie)".

Note

- GenBank® (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</u>) è uno dei più importanti database di raccolta di sequenze nucleotidiche e delle specifiche sequenze amminoacidiche tradotte. Dal 1982, anno della sua costituzione, questo database è cresciuto senza sosta arrivando a contare 4.7 miliardi di sequenze nel 2025. Ciò è reso possibile grazie al fatto che i laboratori di ricerca e i centri di sequenziamento dei genomi possono inviare e richiedere l'inserimento nel database di nuove seguenze di DNA identificate.
- GenBank® è uno dei tanti database sviluppati, amministrati e resi disponibili dal National Center for Biotecnology Information (NCBI; <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>), fondato dal governo degli Stati Uniti d'America nel 1988 con lo scopo di raccogliere e fornire gratuitamente a tutta la comunità scientifica mondiale informazioni biotecnologiche, biomediche, biomolecolari e bioinformatiche.
- Per approfondire ulteriormente le informazioni riportate nella pagina di GenBank® dedicata al DNA del Fago Lambda, il sito NCBI mette a disposizione dell'utente una versione navigabile (link: <u>https://www.ncbi.</u> <u>nlm.nih.gov/genbank/samplerecord/#DefinitionB</u>), in cui grazie a collegamenti ipertestuali interni è possibile approfondire le definizioni e i codici di GenBank® (ad esempio, cosa significa CDS).
- Le sequenze di DNA possono essere scaricate dai database in vari formati: quello maggiormente utilizzato è il FASTA, che ha il vantaggio di fornire la sequenza come testo. Il formato FASTA è strutturato in maniera molto semplice, in quanto si identifica da una linea di intestazione, che inizia con il simbolo ">", seguito dalle informazioni più rilevanti relative alla sequenza (come il nome del gene e l'organismo da cui è stato isolato) e da un numero variabile di righe successive contenenti la sequenza nucleotidica di interesse.

