

Biotecnologie: tecniche e strumenti • Capitolo B6

VERIFICA LE TUE CONOSCENZE

- | | |
|-----|------|
| 1 B | 8 C |
| 2 B | 9 D |
| 3 C | 10 B |
| 4 C | 11 C |
| 5 B | 12 C |
| 6 C | 13 A |
| 7 C | |

VERIFICA LE TUE ABILITÀ

- 14 a. forbici; b. EcoRI; c. palindrome; d. coesive
15 a. negativamento; b. agarosio; c. camera elettroforetica; d. positivo, anodo
16 a. DNA; b. nitrocellulosa; c. capillarità; d. sonda
17 reazione a catena della polimerasi, Kary Mullis, amplificare, primer, DNA polimerasi, trifosfato, magnesio, denaturazione, ibridazione, allungamento, 70°C, denaturi, 1 048 576

18 B
Motivazione: gli enzimi di restrizione sono delle endonucleasi batteriche in grado di riconoscere e tagliare una specifica sequenza del DNA.

19 C
Motivazione: la retrotrascrizione di uno specifico campione cellulare di un organismo da RNA a cDNA permette di ottenere informazioni su tutti i messaggeri espressi da queste tipologie cellulari nell'organismo studiato. Per ottenere una libreria di cDNA, gli mRNA presenti in una cellula sono copiati in cDNA mediante l'enzima trascrittasi inversa. I cDNA sono quindi inseriti in vettori plasmidici, usati per trasformare cellule batteriche. Si selezionano le cellule trasformate, ottenendo una libreria di cellule con diversi cDNA.

20 B
Motivazione: i vettori virali possono accettare frammenti di DNA più lunghi rispetto ai vettori plasmidici.

21 D
Motivazione: la corsa elettroforetica non è un'analisi funzionale; essa permette di confrontare i frammenti di DNA di diversi individui, di valutare qualitativamente la presenza di mutazioni o polimorfismi, di quantificare l'espressione di diversi geni usando una RT-PCR, ma non è in grado di dare risultati funzionali. Durante un'elettroforesi su gel, soluzioni di DNA sono inserite in pozzetti in un gel di agarosio, posto all'interno di una camera elettroforetica. Quando si applica il campo elettrico, le molecole migrano lungo il gel con una velocità che dipende dalla loro dimensione. È quindi possibile verificare la presenza di un frammento di DNA di una certa dimensione, ma non il suo funzionamento.

22 D
Motivazione: l'aggiunta di SDS permette di mantenere la proteina denaturata e conferisce carica negativa che ne permette la migrazione verso l'anodo.

23 C
Motivazione: il trascrittoma è l'insieme delle quantificazioni di tutti gli mRNA presenti nella cellula studiata nel momento in cui è stata effettuata l'analisi. A differenza del genoma il trascrittoma muta durante la vita cellulare.

TEST YOURSELF

- 24 C 25 D; B 26 A 27 D 28 C

29 **Recombinant DNA:** DNA molecule that contains genetic information from two or more different organisms, and that was obtained with genetic engineering techniques.

Plasmid vectors: circular, double-stranded DNA molecules used to transfer genes from one organism to another.

Bacterial transformation: it is a type of

horizontal gene transfer in bacteria; during gene cloning, it is used as a way to insert plasmid vectors in bacterial cells.

PCR: Polymerase Chain Reaction, it is an automated system used to amplify a DNA sequence.

Transcriptome: it refers to the set of all mRNAs in a cell, in a tissue or in an organism.

VERSO L'UNIVERSITÀ

30 A

31 C

32 E

33 C

VERSO L'ESAME

DEFINISCI

34 Endonucleasi: enzimi in grado di tagliare i legami tra nucleotidi adiacenti del DNA all'interno della doppia elica.

Vettori di espressione: vettori che consentono di introdurre un gene in una cellula ricevente e di farlo esprimere, poiché contengono anche le sequenze per la trascrizione del gene di interesse.

Clonaggio: processo attraverso il quale si ottengono molte copie identiche dello stesso gene.

cDNA: DNA copia, si ottiene dalla retrotrascrizione dell'mRNA.

Trasfezione: un tipo di trasferimento genico orizzontale, usato per inserire in cellule eucariotiche vettori plasmidici durante la procedura di clonaggio di un gene.

Agarosio: polisaccaride estratto dalle alghe che solidificando permette la formazione di un gel utilizzato nell'elettroforesi.

Sequenziamento: determinazione della sequenza dei nucleotidi di un frammento di DNA.

Proteomica: analisi della composizione del proteoma.

DISCUTI

35 Concetto fondamentale: l'universalità del codice genetico consente di trasferire geni tra organismi di specie diverse e di sfruttare i comuni meccanismi di trascrizione e traduzione, che rimangono in gran parte invariati anche in organismi molto diversi, come i batteri e gli esseri umani. Per esempio, una cellula batterica può essere usata per esprimere un gene umano.

SPIEGA

36 Concetto fondamentale: il metodo di Sanger per il sequenziamento del DNA prevede l'uso di DNA polimerasi per copiare un DNA stampo e di quattro tipi di nucleotidi modificati, chiamati di-deossinucleotidi (ddNTP). Durante la polimerizzazione, quando sono incorporati i ddNTP causano l'interruzione dell'allungamento della catena. Usando quattro miscele, ciascuna con una certa quantità di un tipo di ddNTP, si ottiene un insieme di frammenti di DNA di diversa lunghezza. Dopo aver caricato su gel di poliacrilammide le miscele e aver così separato i frammenti, è possi-

bile leggere la sequenza, che è complementare a quella della sequenza di DNA di interesse.

Il metodo sviluppato da Sanger è stato alla base dello sviluppo dei moderni sequenziatori.

RIFLETTI

37 Concetto fondamentale: è necessario utilizzare tecniche differenti per inserire un vettore plasmidico all'interno di cellule diverse a causa delle caratteristiche specifiche dei rivestimenti cellulari. Per entrare in una cellula batterica, un plasmide deve attraversare anche la parete batterica, formata di lipopolisaccaridi. Nel caso delle cellule vegetali, i vettori plasmidici devono superare anche la parete cellulare.

Quando la cellula che riceve il vettore plasmidico è un batterio, si parla di trasformazione, quando è una cellula eucariotica di trasfezione.

RICERCA E IPOTIZZA

38 Concetto fondamentale: un problema legato all'analisi del DNA antico è la scarsa quantità di materiale a disposizione, poiché questa molecola si degrada e va incontro a mutazioni nel corso del tempo. Per questo è necessario ottenere una grande amplificazione dei frammenti di DNA, per esempio sfruttando la PCR.

La contaminazione da microrganismi o da DNA umano moderno è un altro problema di questo tipo di studi. Per limitare il problema, sono stati sviluppati protocolli per tenere i laboratori il più possibile privi di fonti di contaminazione.

RICERCA

39 Concetto fondamentale: la proteina GFP ha una struttura cilindrica, formata all'esterno da α -foglietti e all'interno da una β -elica. All'interno della struttura è presente un gruppo di amminocidi, chiamato fluoroforo, in grado di assorbire fotoni di una certa lunghezza d'onda e di emettere fluorescenza.

La proteina può essere utilizzata come marker biologico. È possibile inserire il gene per GFP in un plasmide, e trasferirlo in una cellula di interesse. Le cellule transgeniche esibiscono fluorescenza quando vengono colpite da luce a specifiche lunghezze d'onda.

ANALIZZA E DEDUCI

40 Concetto fondamentale: il sospettato B ha un profilo di frammentazione del DNA identico a quello prelevato sulla scena del crimine.

DEDUCI

41 Concetto fondamentale: i vettori plasmidici possono essere prodotti facilmente e a bassi costi, ma possono avere una minore efficienza di trasferimento nelle cellule riceventi.

Un vantaggio dell'uso dei vettori virali è la possibilità di accettare frammenti di DNA molto più lunghi rispetto ai vettori plasmidici. Uno svantaggio è rappresentato dai sistemi di difesa che hanno sviluppato le possibili cellule riceventi nei confronti dei virus. In alcuni casi, i vettori virali potrebbero scatenare una risposta immunitaria nell'organismo ospite.

I vettori retrovirali offrono la possibilità di inserire in modo stabile un gene all'interno del cromosoma della cellula ricevente.

IPOTIZZA

42 L'enzima A è preferibile: le estremità coesive che si formerebbero dal taglio dell'enzima A favorirebbero l'unione spontanea tra i frammenti di DNA e la formazione di legami a idrogeno. Il DNA ricombinante così formato potrebbe essere saldato dall'enzima DNA ligasi. L'enzima B formerebbe estremità piatte; l'azione della DNA ligasi in questo caso sarebbe meno efficiente, perché i due frammenti non si legherebbero spontaneamente. L'enzima C taglierebbe nel mezzo della sequenza di interesse.