

ZANICHELLI

Fabio Fanti

**Biologia,
microbiologia
e tecniche di
controllo sanitario**

Capitolo 11

Agire sul DNA: le biotecnologie

1. Origine ed evoluzione delle biotecnologie

Biotecnologia:

“Scienza che si occupa delle tecnologie che utilizzano organismi viventi o molecole da essi prodotte a scopi agroalimentari, farmacologici e diagnostici al fine di migliorare le condizioni di vita”

(Karl Ereky, 1917)

1. Origine ed evoluzione delle biotecnologie

Tipi di biotecnologie

TRADIZIONALI

Tecniche senza
consapevolezza scientifica

- Produzione di bevande alcoliche, pane, yogurt, formaggi
- Selezione di specie animali e vegetali

MODERNE

Dopo le scoperte sul ruolo del
DNA

- Ingegneria genetica
- Editing genomico
- Sequenziamento
- Biologia sintetica

Necessarie riflessioni su
biosicurezza, etica e morale

1. Origine ed evoluzione delle biotecnologie

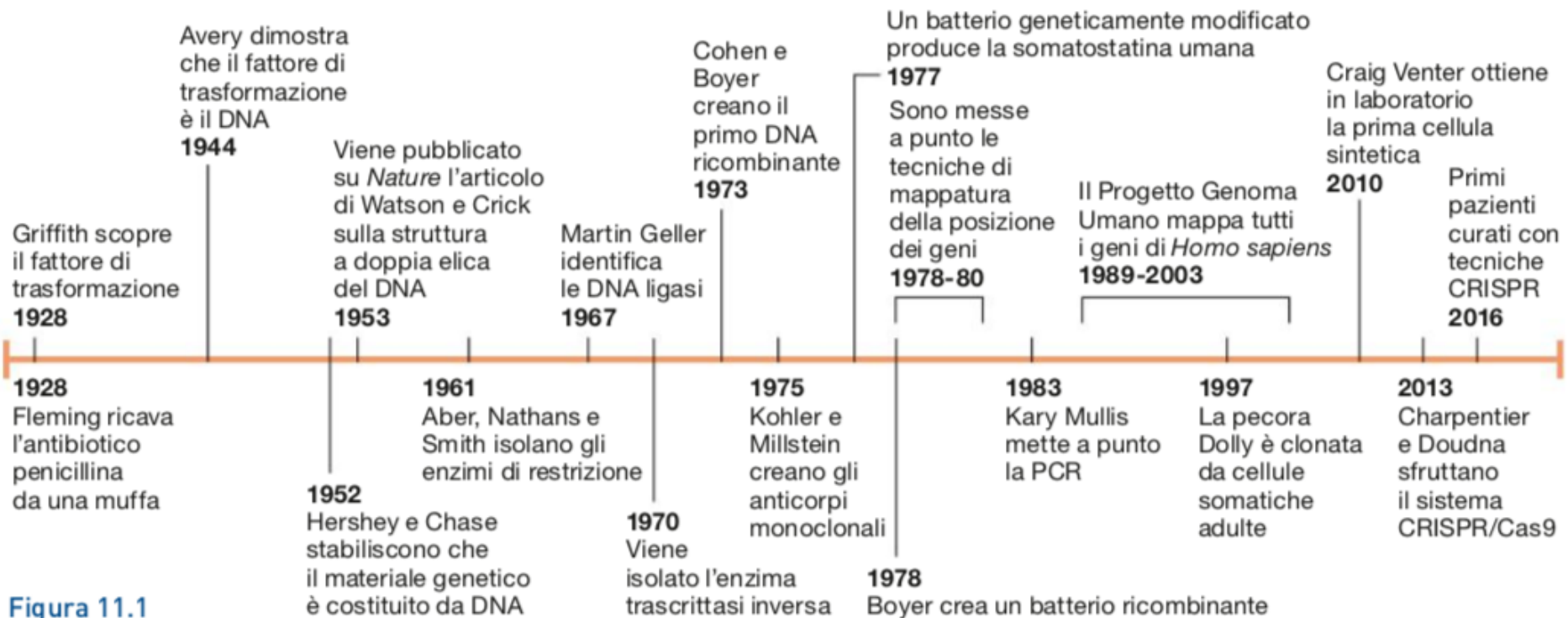
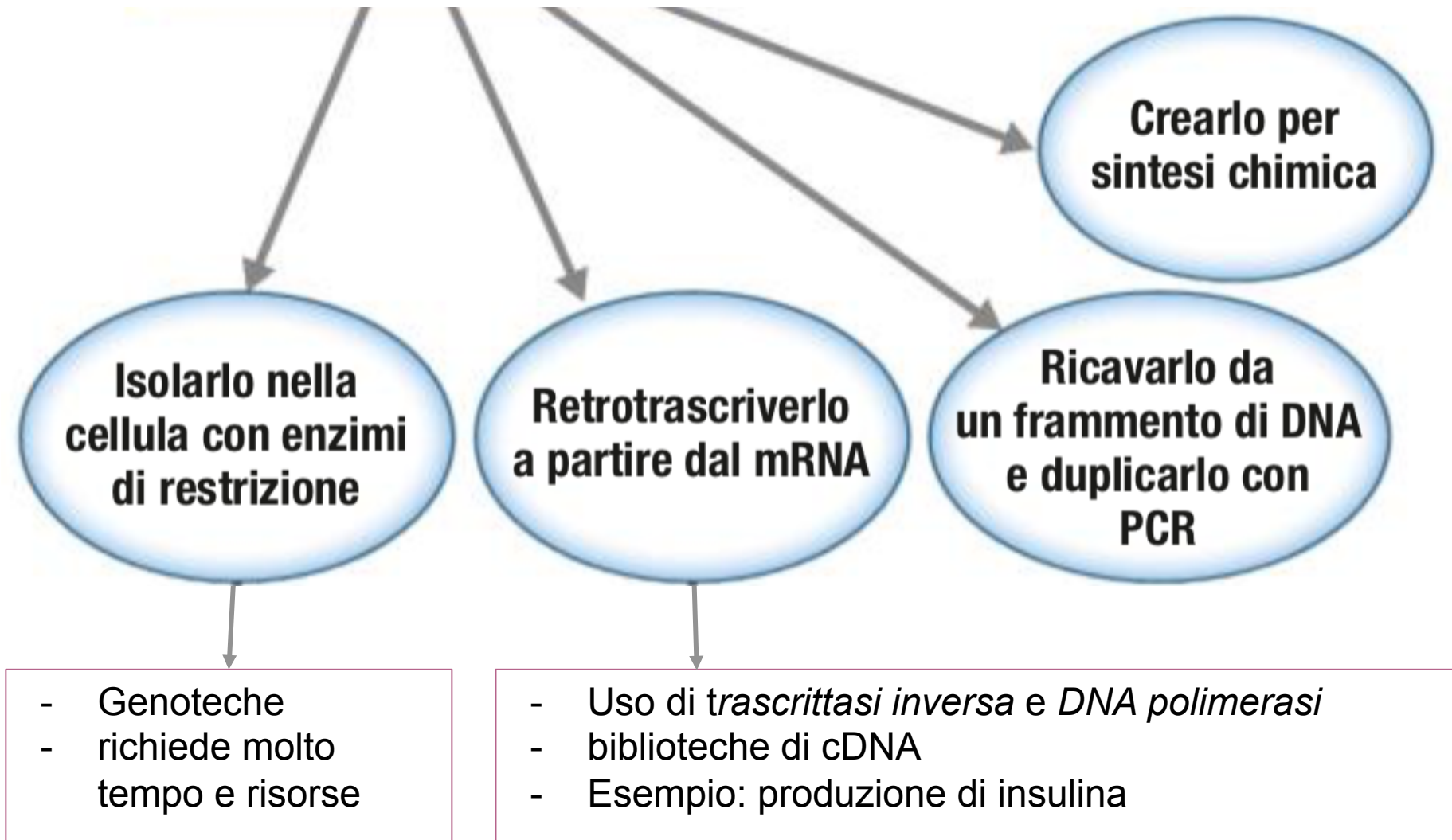


Figura 11.1

2. Come isolare un gene di interesse



2. Come isolare un gene di interesse

Endonucleasi di restrizione: enzimi che tagliano il DNA quando incontrano sequenze specifiche dette *siti di restrizione*.

Nome dell'enzima	Batterio di origine	Sequenza di restrizione	Taglio
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'-AG CT-3' 3'-TCGA-5'	Taglio SIMMETRICO (<i>blunt ends</i>)
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5'	
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	Taglio ASIMMETRICO (<i>cohesive ends</i> o <i>sticky ends</i>)
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'-GGATCC-3' 3'-CTTAG G-5'	

2. Come isolare un gene di interesse

Endonucleasi di restrizione: enzimi che tagliano il DNA quando incontrano sequenze specifiche

(TAGLIA)

+

Ligasi: enzimi che legano i frammenti di restrizione

(INCOLLA)

=

DNA RICOMBINANTE

3. L'elettroforesi su gel di frammenti del DNA

Tecnica che sfrutta le differenze dimensionali e fisico/chimiche dei frammenti di DNA per separarli.

Questa tecnica prevede 6 fasi:

1. Preparazione del gel.
2. Raccolta dei campioni di DNA da analizzare.
3. Caricamento dei campioni nei pozzetti del gel.

3. L'elettroforesi su gel di frammenti del DNA

4. Separazione dei frammenti di DNA tramite elettroforesi.
5. Colorazione delle molecole di DNA con bromuro di etidio e misurazione della distanza percorsa dal pozzetto.
6. Determinazione della curva standard per determinare le dimensioni dei frammenti.

SCOPI:

- valutare il peso molecolare dei frammenti
- estrarre singoli frammenti di interesse
- individuare il gene di interesse** (con sonde molecolari)

4. Localizzare un gene tramite sonde molecolari

Le **sonde molecolari** sono frammenti specifici di DNA o RNA **marcato**, che si appaiano (ibridazione o *annealing*) a tratti di DNA bersaglio complementare o molto simile (a singolo filamento)

Si costruiscono per clonazione in vettori molecolari, con trascrittasi inversa, con PCR, per sintesi chimica.

4. Localizzare un gene tramite sonde molecolari

I marcatori possono essere di due tipi.

Radioattivi (**sonde calde**)

-³²P o ³⁵S

-molto sensibili

-rivelazione con lastre autoradiografiche

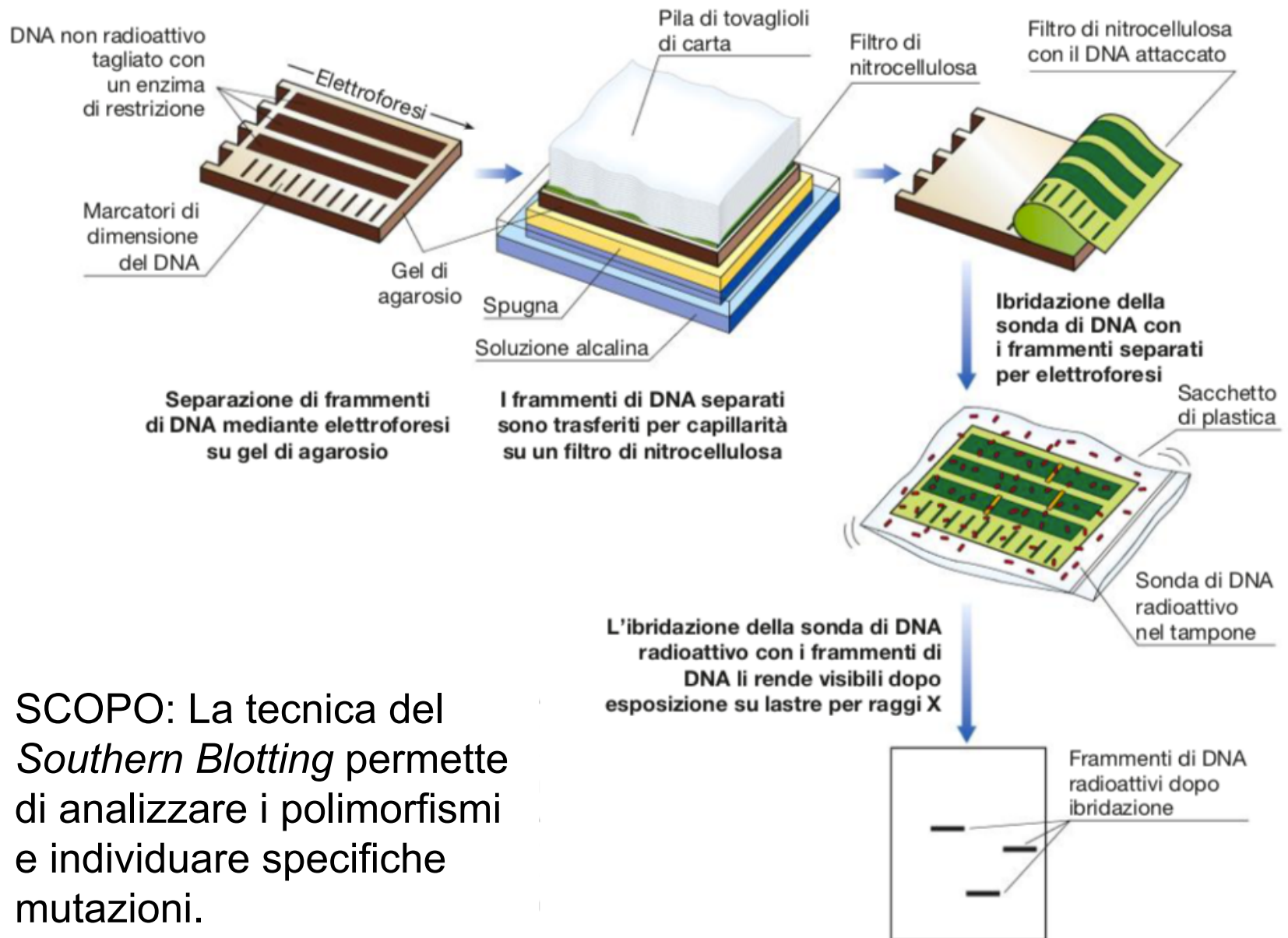
-problemi per la natura radioattiva

Non Radioattivi (**sonde fredde**)

-**Fluorocromi**, rivelati con microscopio a fluorescenza

-**Biotina o digossigenina**, rivelate indirettamente con tecniche immunoenzimatiche o Mab

Tecniche di ibridazione su filtro



SCOPO: La tecnica del *Southern Blotting* permette di analizzare i polimorfismi e individuare specifiche mutazioni.

► Tecniche di ibridazione *in situ* (FISH)

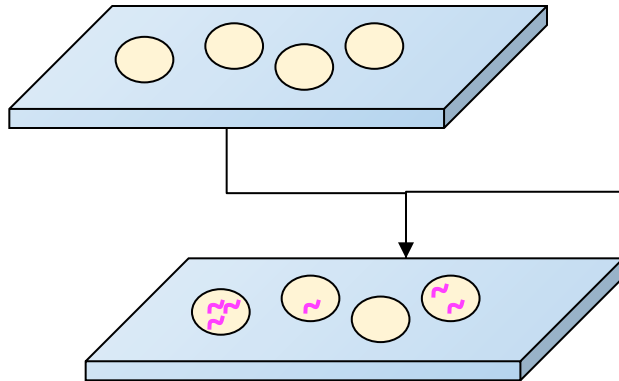
SCOPO: La tecnica di ibridazione *in situ* identifica la posizione del gene, oltre che la presenza.

mRNA (citoplasma)

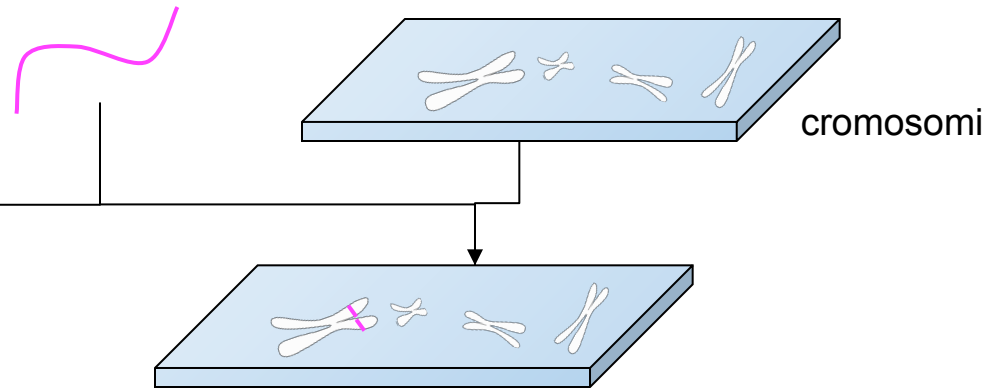
DNA (cromosomi)

SONDA

cellule su vetrino permeabili alla sonda



analisi espressione genica



ricerca di traslocazioni cromosomiche

5. Inserire geni nelle cellule: i vettori molecolari

Un vettore molecolare è un elemento genetico extracromosomico che può contenere e trasportare un frammento di DNA esogeno (inserto) e mantenerlo stabile nella cellula ospite.

Requisiti per un vettore:

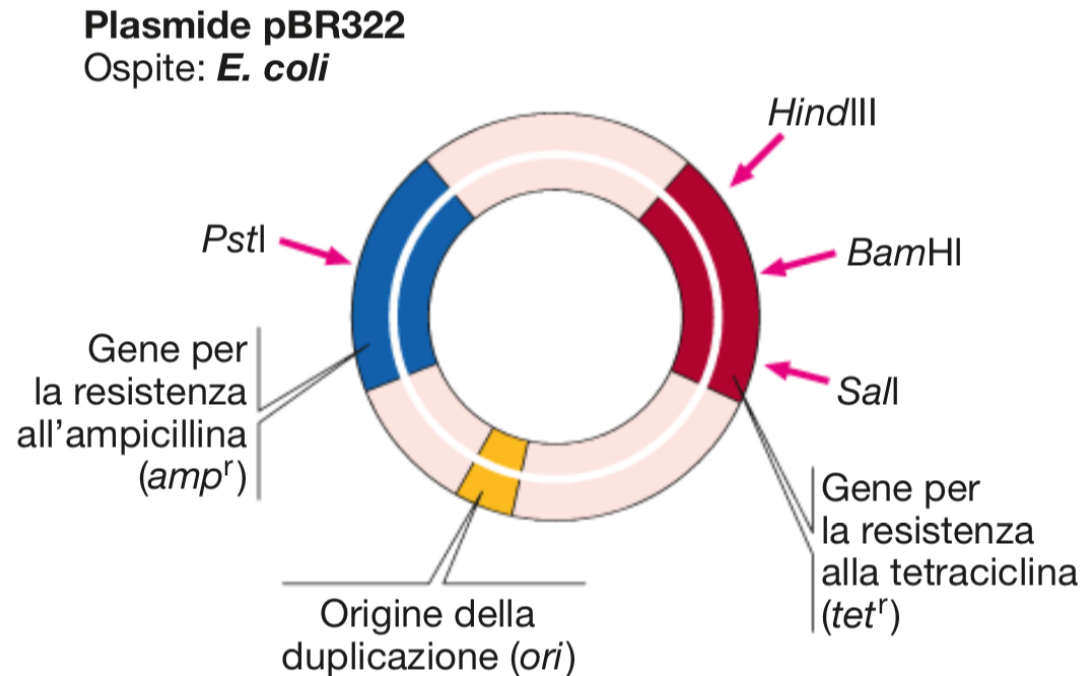
- facile ingresso nella cellula ospite
- stabilità e compatibilità con la cellula ospite
- capacità di autoreplicazione
- presenza di siti di restrizione unici
- presenza di geni marcatori selezionabili

6. I vettori batterici: i plasmidi

Un plasmide è una molecola circolare di DNA extracromosomica a doppio filamento dotata di replicazione autonoma rispetto al cromosoma cellulare. Si trova nei batteri e nei lieviti.

Caratteristiche:

- piccole dimensioni
- possono essere presenti in numerose copie
- presentano un sito multiplo di clonaggio (*polylinker*)
- geni marcatori (resistenza antibiotici)
- svantaggio: possono ospitare frammenti di 10 000 nucleotidi al massimo



7. Altri vettori: batteriofagi, cosmidi, BAC e YAC

BATTERIOFAGI o fagi

possono trasportare DNA di dimensioni superiori rispetto ai plasmidi (10-22 kpb)

COSMIDI (plasmidi + DNA fagico)

- possono trasportare DNA di grandi dimensioni (45 kpb)
- possono replicarsi come un plasmide

BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)

derivano dal fattore F di *E.coli*

YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)

- inserti molto lunghi (2000 kpb)

8. Come usare i vettori di espressione

Vettore di espressione

contiene gli elementi regolatori per la trascrizione e traduzione corretta:

- sito *polylinker* (in cui viene inserito il **DNA esogeno**)
- gene promotore
- sequenza che lega il ribosoma
- gene terminatore



Procariotico

potenziali problemi in caso di produzione di proteine ricombinanti tossiche per la cellula

Eucariotico

espressione transiente: se il genoma non è integrato
produzione stabile, se il genoma è integrato

9. Le caratteristiche delle cellule ospiti

1. Devono fornire un ambiente adatto per il vettore (facilità di replicazione e inserimento)
2. Devono riprodursi facilmente, velocemente e con costi bassi (anche *in vitro*)
3. Devono avere mutazioni compatibili con i geni marcatori (caratteristiche che facilitano la selezione dei ricombinanti)
4. Devono essere geneticamente stabili (bassa frequenza di mutazioni)
5. NON devono produrre enzimi di restrizione
6. NON devono essere patogene per l'uomo

9. Le caratteristiche delle cellule ospiti

Esempi di cellule ospiti	VANTAGGI	SVANTAGGI
<i>Escherichia coli</i>	molti ceppi compatibili con plasmidi ingegnerizzati	i procarioti non possono effettuare modifiche post-traduzionali
<i>Bacillus subtilis</i>	metaboliti secreti nel terreno di coltura	
Lieviti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	divisione rapida; facilmente coltivabili; genoma di dimensioni ridotte.	non possono effettuare GLICOSILAZIONE
Cellule di insetto	coltivabili <i>in vitro</i> ; possono effettuare glicosilazione; costi ridotti; non infettabili da patogeni umani.	difficile produzione su larga scala non possono effettuare tutte le modifiche post-traduzionali
Piante	vasto numero di proteine producibili; non infettabili da patogeni umani; possibile produzione su larga scala; costi ridotti.	

10. Trasferire il DNA all'interno di una cellula

Trasformazione mediante shock termico



Le cellule batteriche sono immerse in una soluzione di ioni calcio a bassa temperatura. La temperatura viene poi innalzata oltre i 40°C e riportata in tempi brevi a 2-4°C. Lo shock termico provoca la formazione di pori a livello della membrana cellulare, permettendo l'ingresso del vettore plasmidico

Elettroporazione




Le cellule batteriche o eucariotiche sono sottoposte per pochi secondi a un campo elettrico che, alterando il potenziale elettrico di membrana, provoca l'apertura di canali che consentono l'ingresso del vettore.

Metodo biolistico



Il DNA da inserire viene adeso a nanoparticelle di oro o di tungsteno che vengono poi sparate attraverso la parete cellulare con una speciale pistola ad aria compressa, detta pistola genica (*gene gun*). Questa tecnica è utilizzata per la trasfezione di cellule vegetali.

10. Trasferire il DNA all'interno di una cellula

Microiniezione	Fusione di protoplasti	Trasfezione	Bioingegneri naturali	Virus apatogeni
 <p data-bbox="59 832 639 1129">Il vettore plasmidico viene iniettato direttamente all'interno della cellula ricevente grazie a un minuscolo ago di vetro. Questa tecnica è utilizzata per il trasferimento di DNA esogeno in cellule embrionali.</p>	<p data-bbox="678 361 993 796">In presenza di <i>polietilenglicole</i> le due cellule tendono a fondersi, e il DNA delle cellule si può ricombinare spontaneamente. Tecnica usata per cellule vegetali</p>	<p data-bbox="1037 361 1282 836">Uso di liposomi contenenti il DNA da inserire, si fondono alle membrane plasmatiche di cellule eucariotiche in coltura.</p>	<p data-bbox="1321 361 1580 705">Si utilizza il <i>fattore Ti</i> di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in grado di integrarsi con facilità nel DNA dell'ospite.</p>	<p data-bbox="1640 361 1818 525">Usati virus derivati da particolari retrovirus</p>

11. Come selezionare i cloni ricombinanti

Inattivazione inserzionale

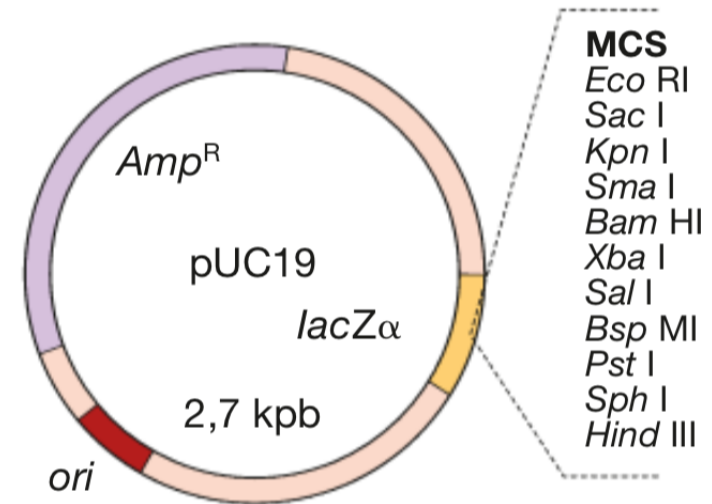
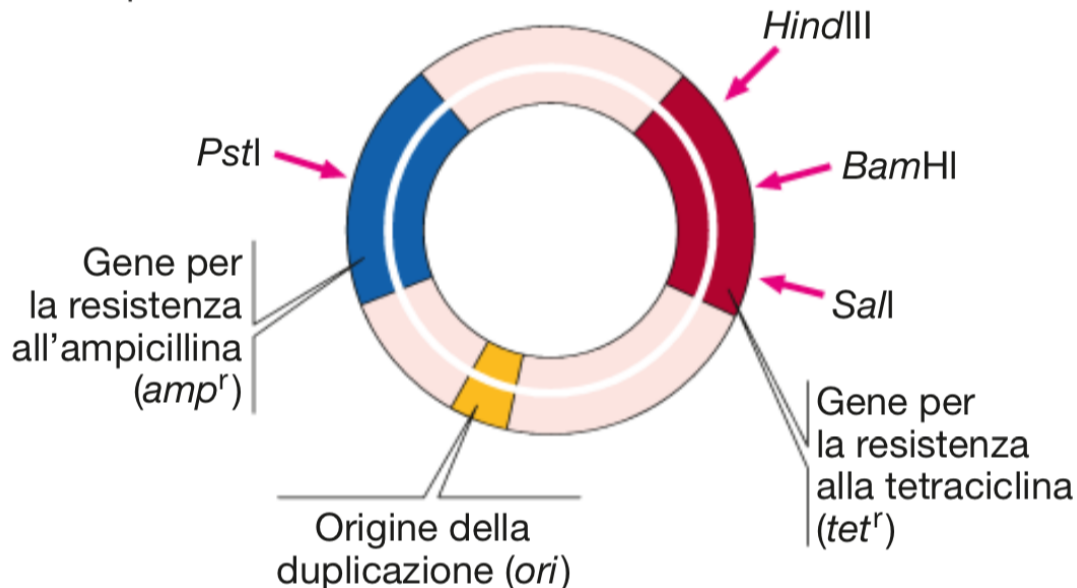
a. con *plasmide pBR322*

b. α -complementazione con *plasmide pUC*

c. proteina *GFP*

Plasmide pBR322

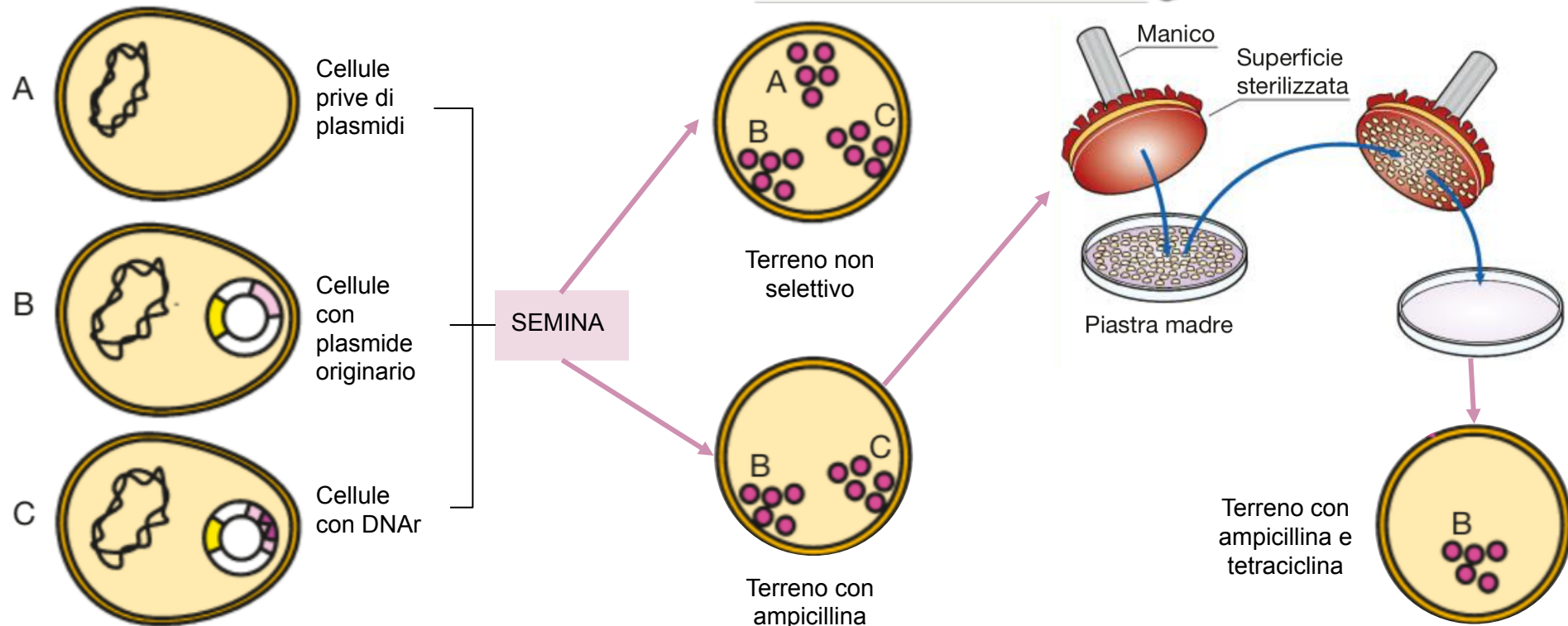
Ospite: *E. coli*



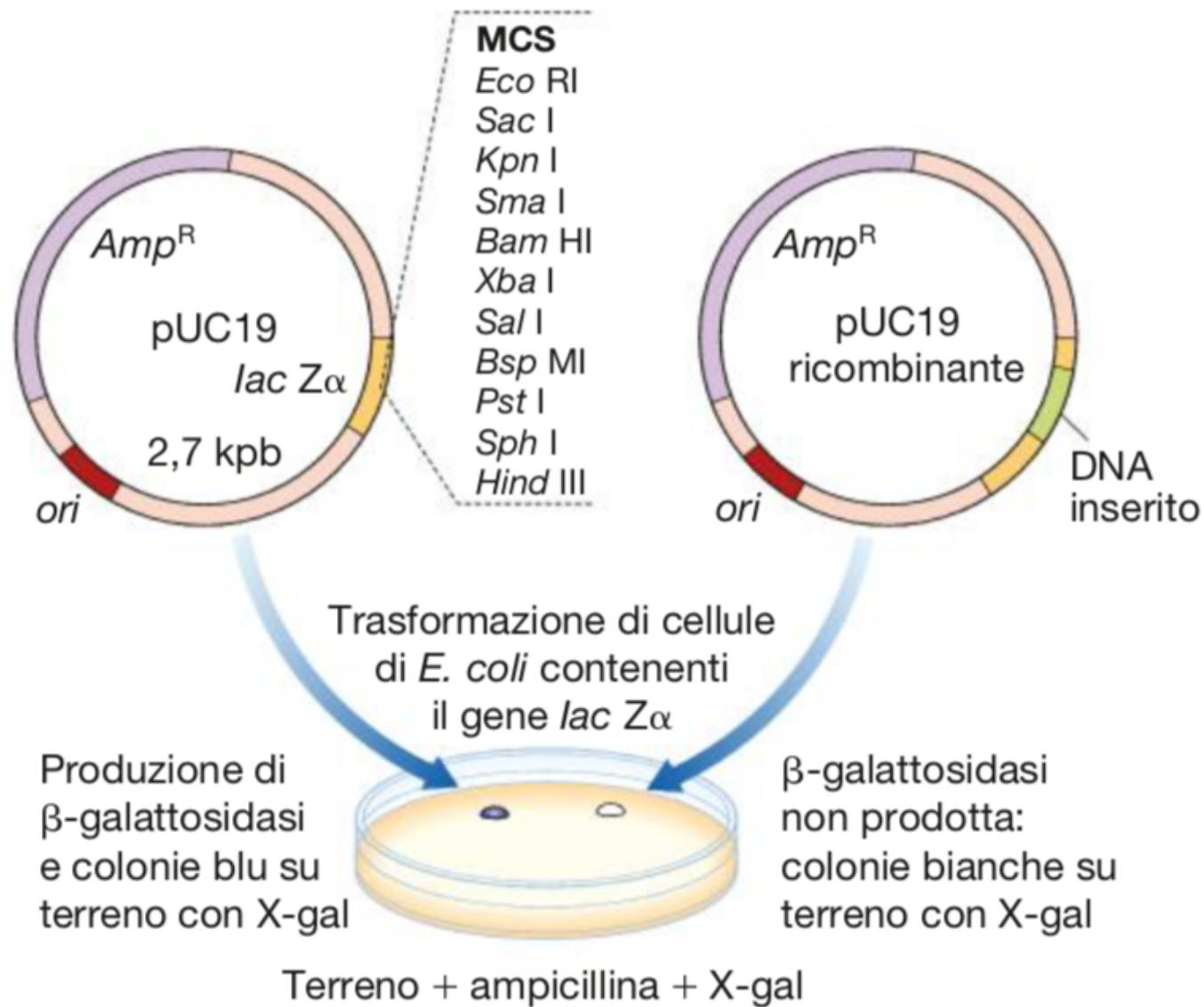
11. Inattivazione inserzionale con *plasmide pBR322*



possibili combinazioni:

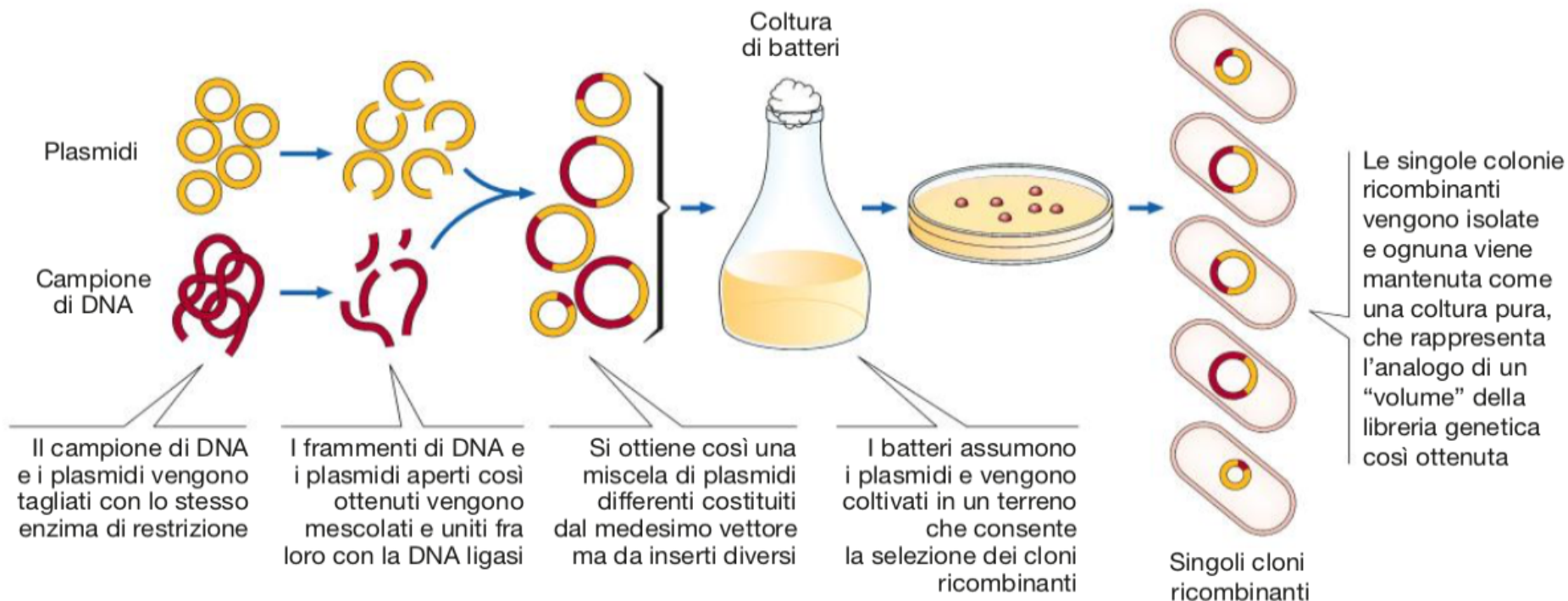


11. α -complementazione con *plasmide pUC*



12. Le librerie geniche: una collezione di cloni

Scopi delle **librerie geniche**: studio o produzione commerciale



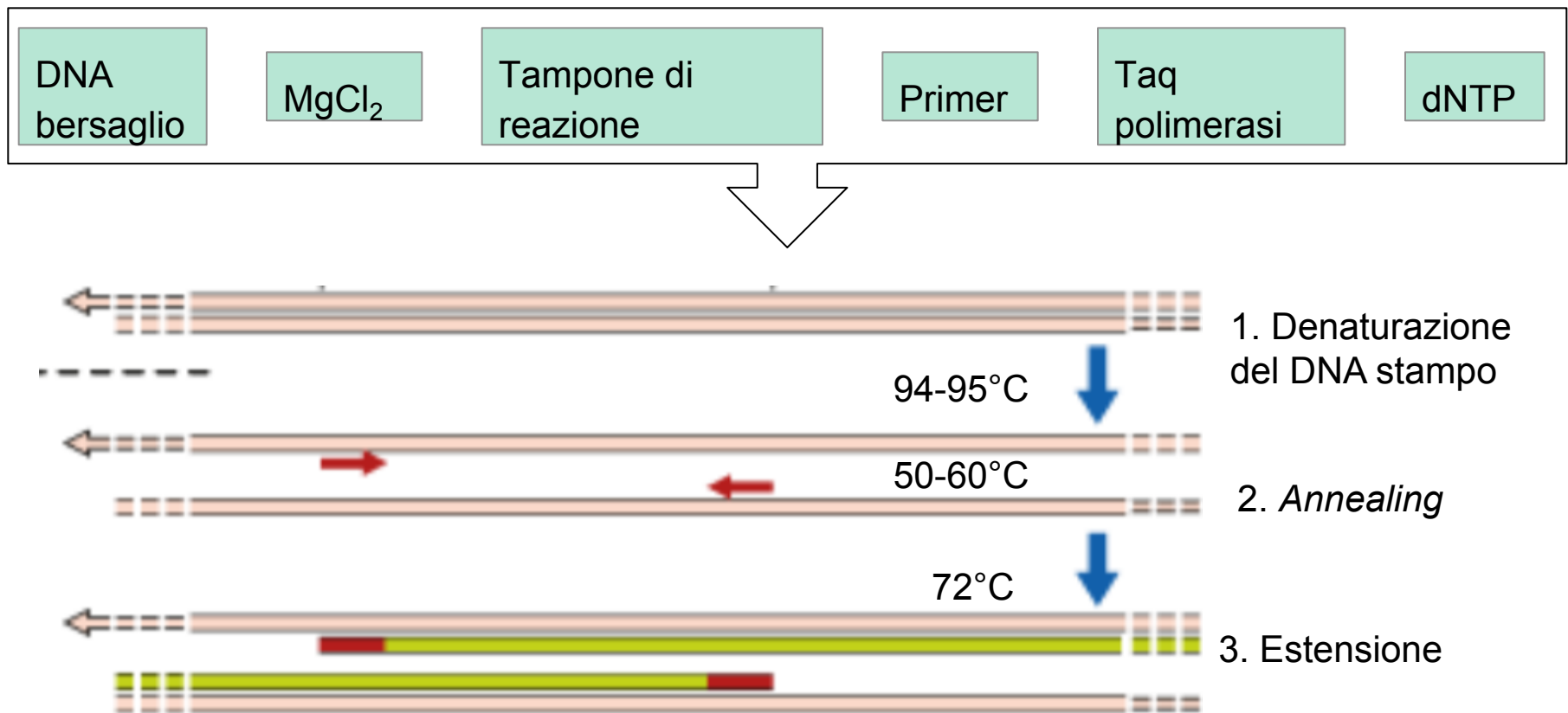
12. Le librerie geniche: una collezione di cloni

Librerie a cDNA: ottenute per trascrizione inversa dell'mRNA, forniscono informazioni sui geni trascritti da un particolare tessuto in una determinata fase dello sviluppo. Si ottengono per:

1. Estrazione di mRNA dalla cellula;
2. Trascrizione inversa di mRNA a DNA;
3. Formazione dell'ibrido RNA/DNA a filamento singolo;
4. Eliminazione dell'mRNA;
5. Intervento della DNA polimerasi che sintetizza il filamento di DNA complementare.

13. La PCR: reazione a catena della polimerasi

La PCR è una tecnica per l'amplificazione in vitro di frammenti di DNA.



Questo ciclo viene ripetuto fino a ottenere molte copie di DNA

13. La PCR: reazione a catena della polimerasi

Applicazioni

diagnosi prenatale, malattie genetiche e infettive, diagnostica oncologica, studi evolutivisti, monitoraggio ambientale, ricerca di OGM, medicina forense

Varianti

- reverse transcriptase PCR*, per ottenere DNA da RNA
- PCR Real Time*, per misurare l'andamento della reazione in tempo reale

14. Le modalità di sequenziamento del DNA

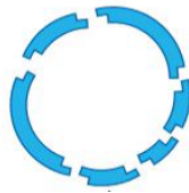
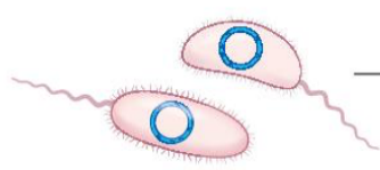
Sequenziare: determinare l'ordine di nucleotidi in un frammento di DNA.

Metodo Sanger:

1. DNA da sequenziare (max 1000 nucleotidi)
2. Polimerasi, Primer e dNTP
3. ddNTP con fluorocromi
4. Separazione dei frammenti ed elettroforesi
5. Lettura della sequenza

Procedura di sequenziamento di un intero genoma:

- dividere il genoma in migliaia o milioni di frammenti
- inserire i frammenti in vettori (BAC o cosmidi)
- sequenziare i frammenti
- confrontare i frammenti e ordinarli con software specifici

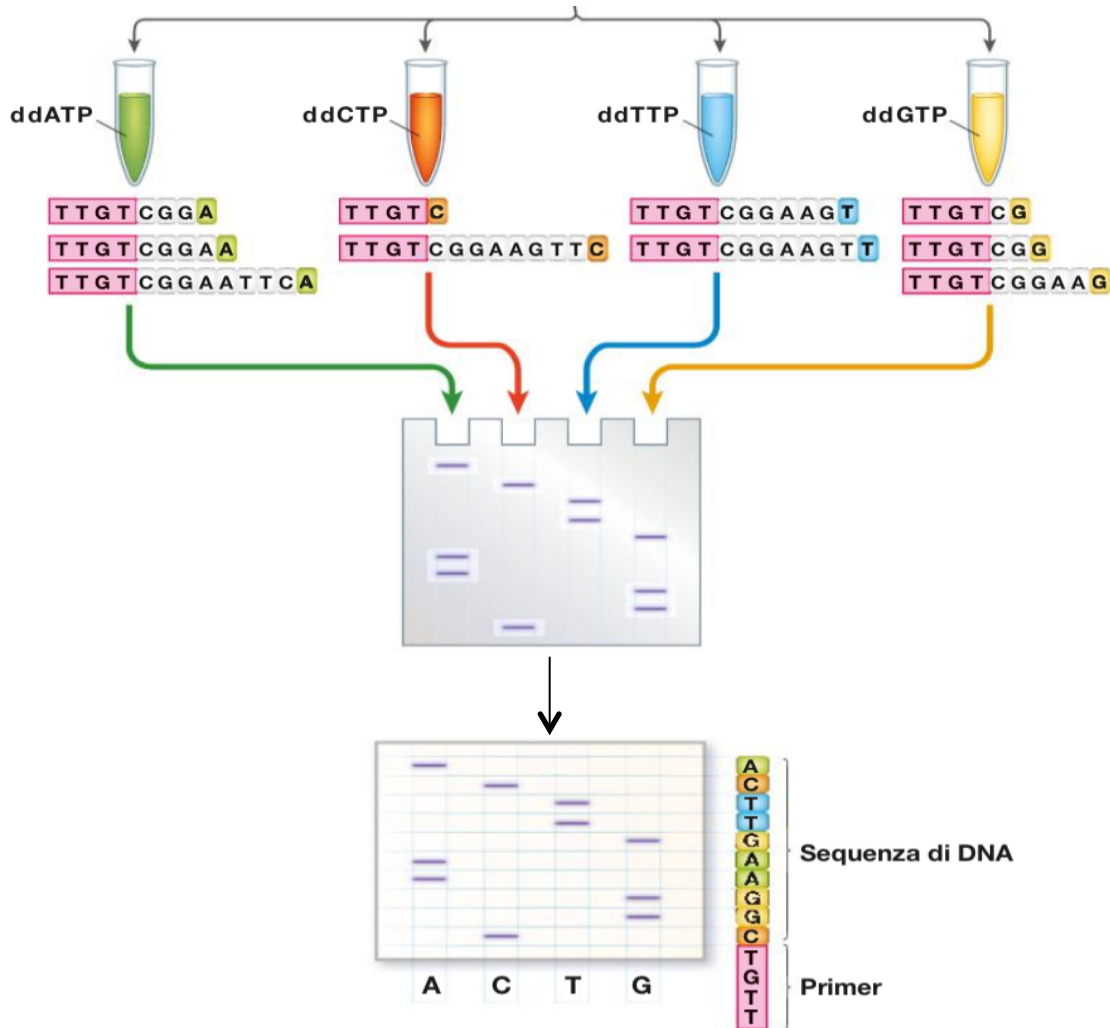


3' **AACAGCCTTCAAGT** 5'

+ 5' **TTGT** 3' primer

+ DNA polimerasi

+ dATP, dCTP, dTTP, dGTP



15. Dal Progetto Genoma Umano alla nascita della genomica

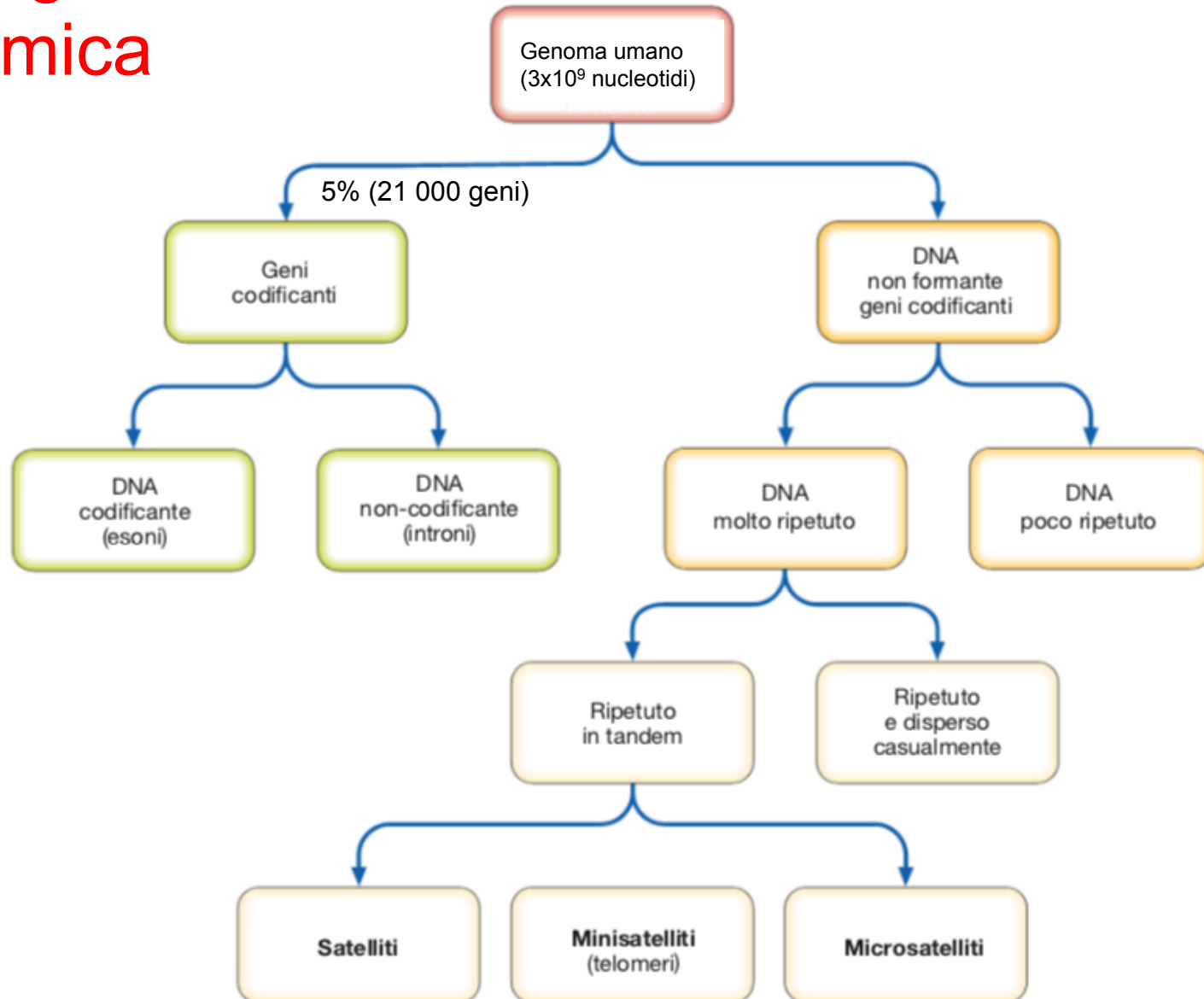
sequenziamento di:

1989-2003 – genoma umano

1996 – genoma di lievito

1997 – *Escherichia coli*

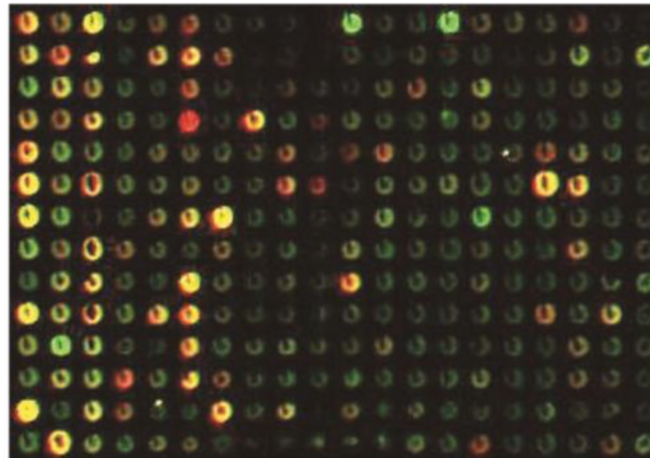
2000 – *Drosophila melanogaster*



16. DNA microarray o DNA chip

Applicazioni:

- analisi cellule tumorali
- diagnosi di aneuploidie
- ricerca di mutazioni non rilevabili con cariotipo



Punti **verdi**: geni espressi più (o solo) nel campione A

Punti **rossi**: geni espressi più (o solo) nel campione B

Punti **gialli**: geni espressi a un livello simile in A e B

16. DNA microarray o DNA chip

