

**ZANICHELLI**

Fabio Fanti

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

## Capitolo 12

# Biotecnologie nel settore agrario, zootecnico, sanitario

# 1. Le aree di applicazione delle biotecnologie

- Produzione di proteine a scopo terapeutico
- Sviluppo di vaccini e nuovi metodi per la somministrazione
- Produzione di anticorpi monoclonali
- Diagnosi di malattie genetiche e infettive
- Modifiche genetiche di animali per la produzione di proteine ricombinanti o tessuti e organi
- Modifiche genetiche di piante per la resistenza a patogeni e cambiamenti climatici
- Identificazione delle “impronte genetiche” (*DNA fingerprinting*)”
- Utilizzo di microrganismi per la bonifica di siti inquinati
- Identificazione di microrganismi

## Green Biotech

- Monitoraggio ambientale
- Resa delle colture
- Prevenzione degli inquinamenti
- Biorimedia

## White Biotech

- Antibiotici
- Amminoacidi e proteine
- Green chemistry

## Red Biotech

- Diagnosi
- Terapie
- Vaccini

## 2. Gli animali transgenici: gli scopi

### COME INSERIRE IL GENE ESOGENO

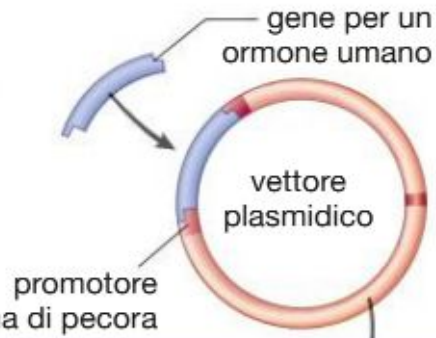
- inserimento di retrovirus ai primi stadi di sviluppo embrionale
- microiniezioni di DNA nella cellula uovo fecondata
- spermatozoi di mammiferi come vettori di DNA esogeno
- inserimento di un nucleo somatico GM in cellule uovo senza nucleo

### SCOPI

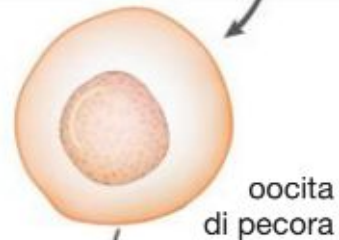
- Produzione di proteine ricombinanti (*gene pharming*)
- Modelli animali per lo studio di malattie genetiche (*gene targeting* e *topi knock-out*)
- Produzione di tessuti e organi per xenotrapianti

## 2. Gli animali transgenici: *gene pharming*

**1** In un vettore plasmidico sono inseriti il gene per un ormone umano e il promotore per la  $\beta$ -lactoglobulina di pecora. Il promotore è attivo solo nelle cellule mammarie ovine.

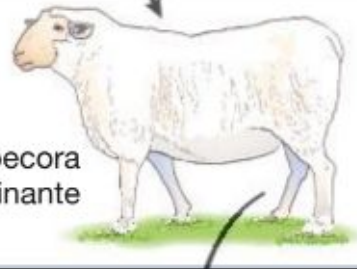


**2** Il plasmide viene inserito in un oocita di pecora. In questo modo il gene per l'ormone umano entra a far parte del DNA della pecora.



**3** L'oocita viene fecondato e impiantato nell'utero di una pecora, che dà alla luce una pecora ricombinante.

pecora ricombinante



**4** La pecora ricombinante produce latte che contiene l'ormone umano.

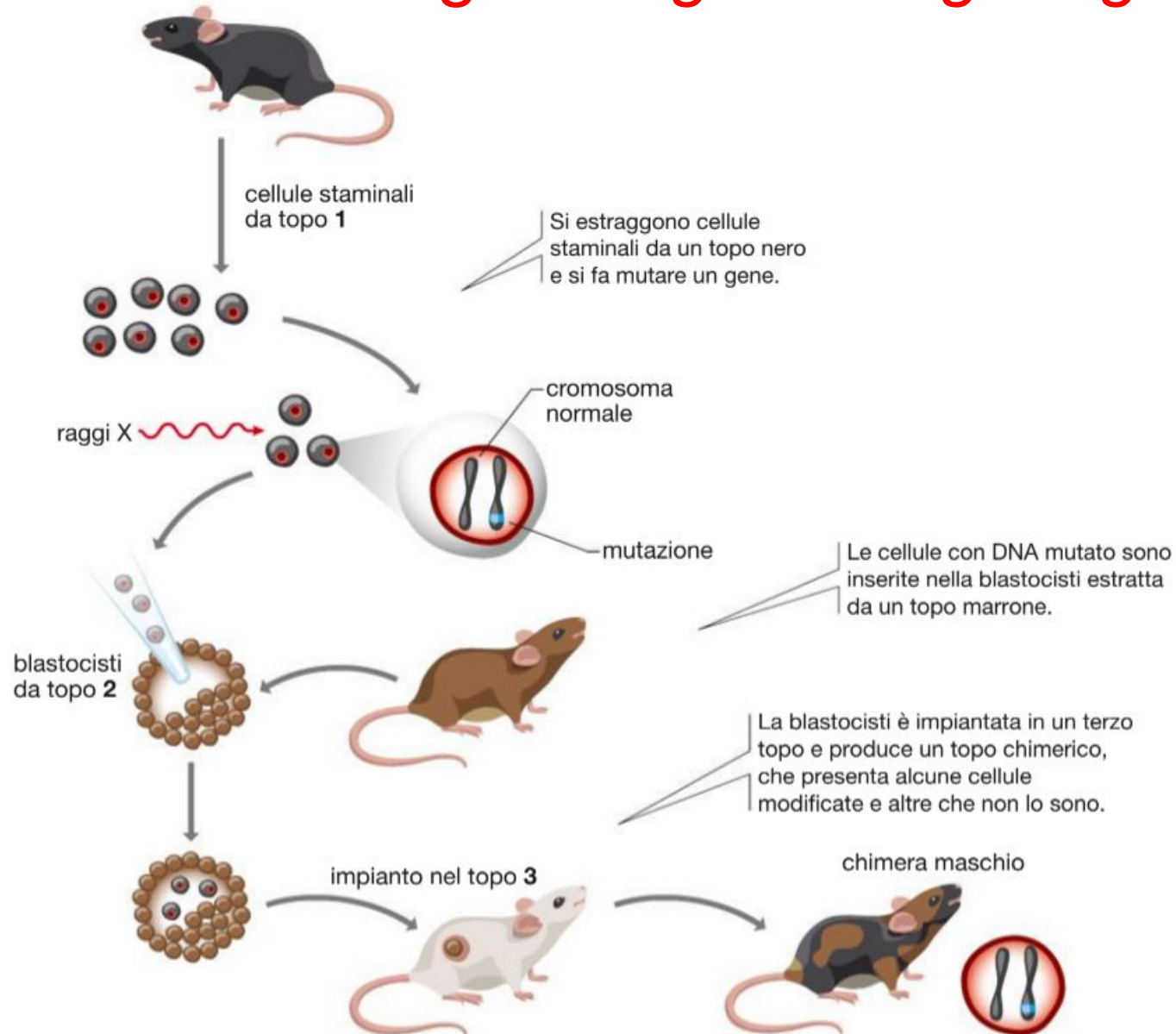


**5** Attraverso la purificazione del latte si isola l'ormone umano.



fiale contenenti l'ormone purificato

## 2. Gli animali transgenici: *gene targeting*



### 3. Le piante transgeniche: obiettivi

- aumentare la resistenza a parassiti e patogeni (es.: *gene Bt*)
- ottenere piante resistenti a erbicidi (es.: *Glifosato*)
- migliorare le proprietà nutrizionali (es.: *Golden Rice*)
- produrre molecole di interesse commerciale e farmacologico

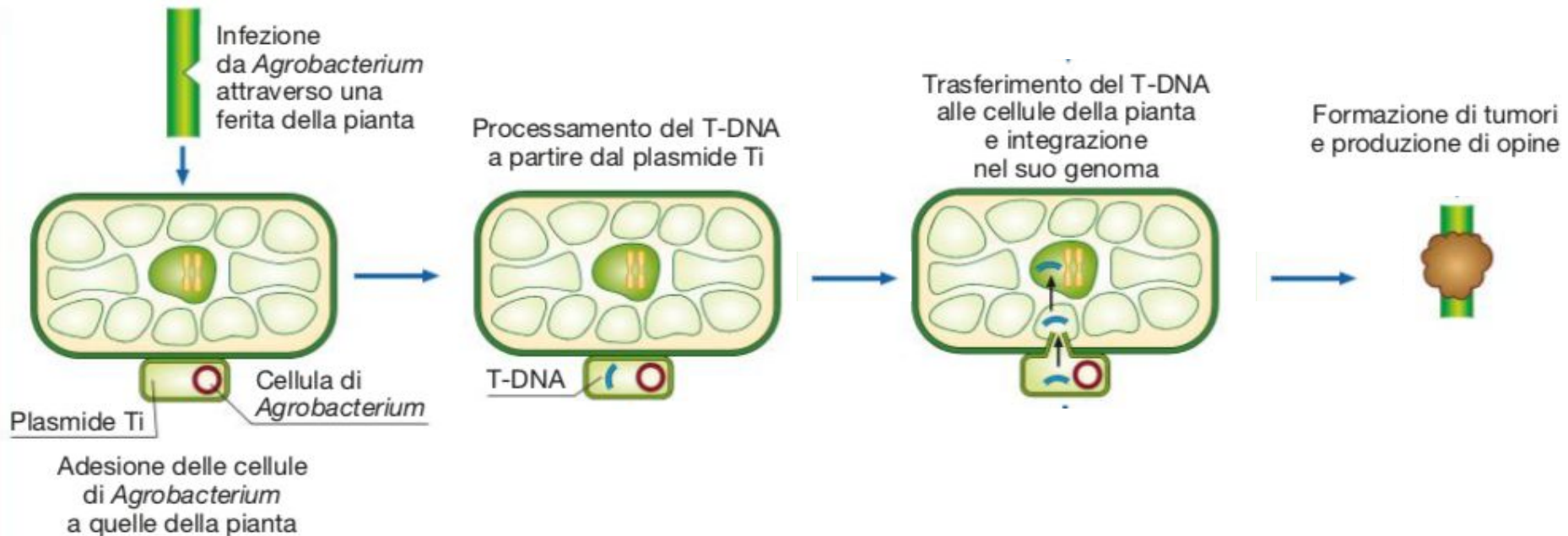




# 3. Le piante transgeniche: obiettivi e problemi

## COME INSERIRE IL GENE ESOGENO

- plasmide Ti (*Agrobacterium tumefaciens*)
- metodo biobalístico (per monocotiledoni, in cui *Agrobacterium* non è efficace)



# 3. Le piante transgeniche: problemi

## RESISTENZA

Tutte le volte che si cerca di eliminare un parassita i meccanismi di selezione portano all'evoluzione.

- Strategia *high dose/refuge* per mantenere gli insetti sensibili alla tossina Bt.
- Definite distanze che minimizzano il rischio di ibridazione tra piante GM resistenti agli erbicidi con varietà selvatiche

## SICUREZZA

I cibi derivati da piante GM sono sicuri tanto quanto, e a volte di più, degli alimenti tradizionali.

Ad esempio:

Gli OGM Bt e i loro derivati (latte e formaggi di animali alimentati ad OGM) contengono minori quantità di *fumonosine*

## ALLERGIE

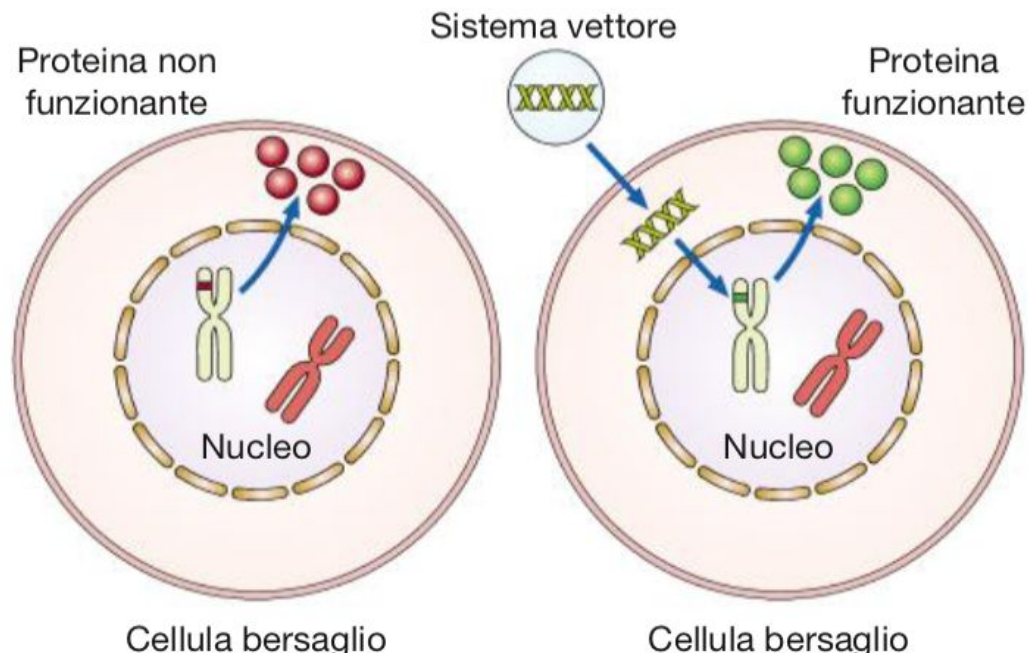
Non vi sono prove che gli OGM possano aumentare le allergie nei consumatori.

Se una pianta GM sottoposta a *screening* (obbligatorio) risulta allergenica, non viene approvata.

## 4. La terapia genica e i farmaci cellulari

### Tipi di correzioni introducibili con la terapia genica:

- inserimento di una copia del gene non mutato
- correzione di alleli mutati attraverso *genome editing*
- inattivazione del gene mutato



# 4. La terapia genica e i farmaci cellulari

## Tipi di vettori (apatogeni)

- *retrovirus*
- liposomi
- microiniezione

## Metodi

- *in vivo*: somministrazione diretta nel paziente con vettori virali o liposomi.
- *ex vivo*: prelievo di cellule, modifica genetica, e reintroduzione nel paziente

## 4. La terapia genica e i farmaci cellulari

**Le cellule umane che possono essere geneticamente modificate sono SOLO quelle della linea somatica.**

**La manipolazione delle cellule germinali umane è VIETATA per motivi ETICI**

## 5. I metodi per il *genome editing*

### **CRISPR**

*(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)*

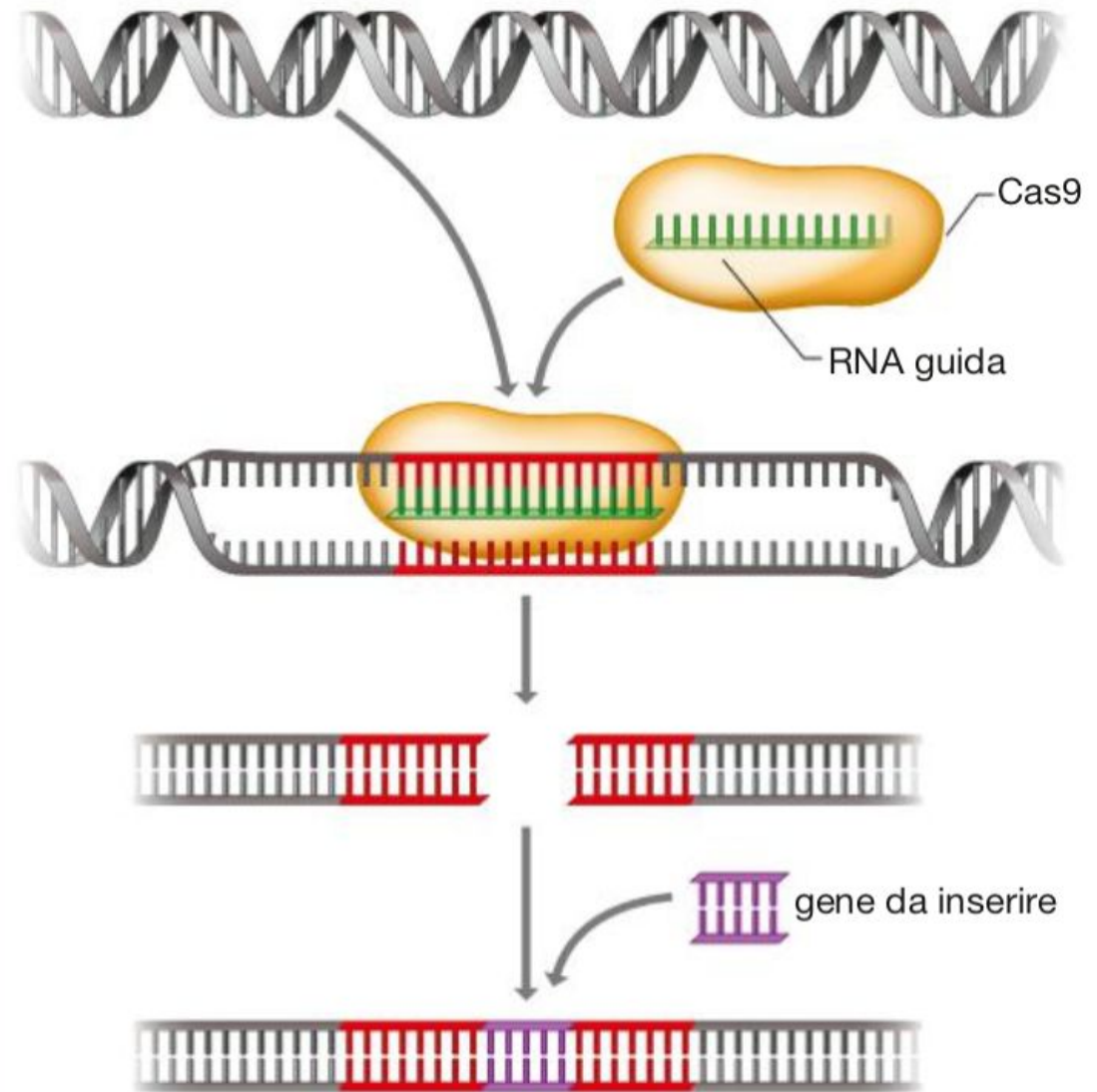
Sistema di difesa batterico, che associato alla endonucleasi **Cas9** permette di tagliare il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche.

Le applicazioni sono numerose, sia in campo ambientale che in medicina, e in continua crescita

## 5. I metodi per il *genome editing*

Con questa tecnologia è possibile:

- tagliare una sequenza di DNA, inattivandola
- inserire un filamento di DNA in corrispondenza della sequenza di taglio



## 6. La clonazione di mammiferi

### Storia delle clonazioni animali:

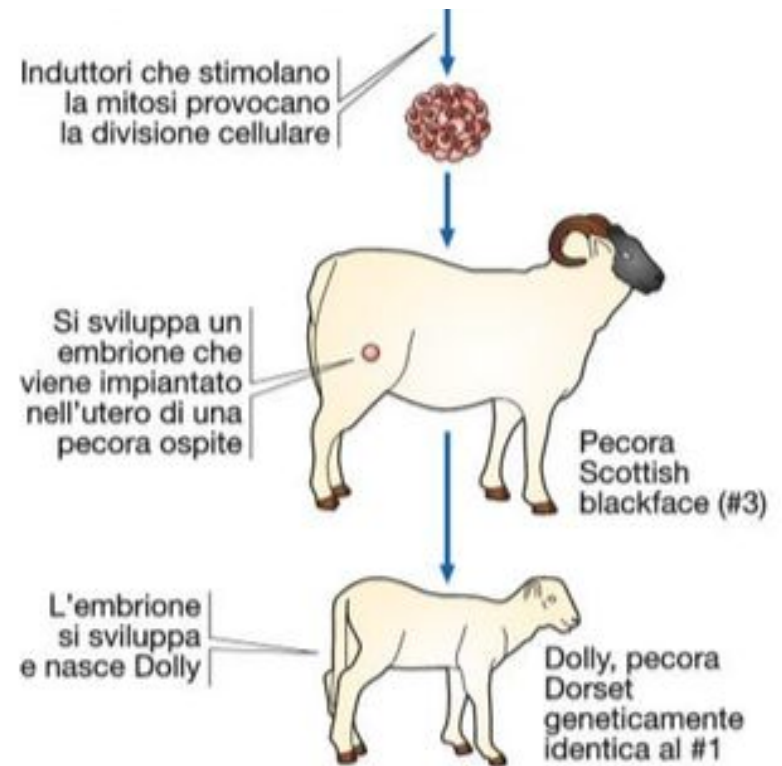
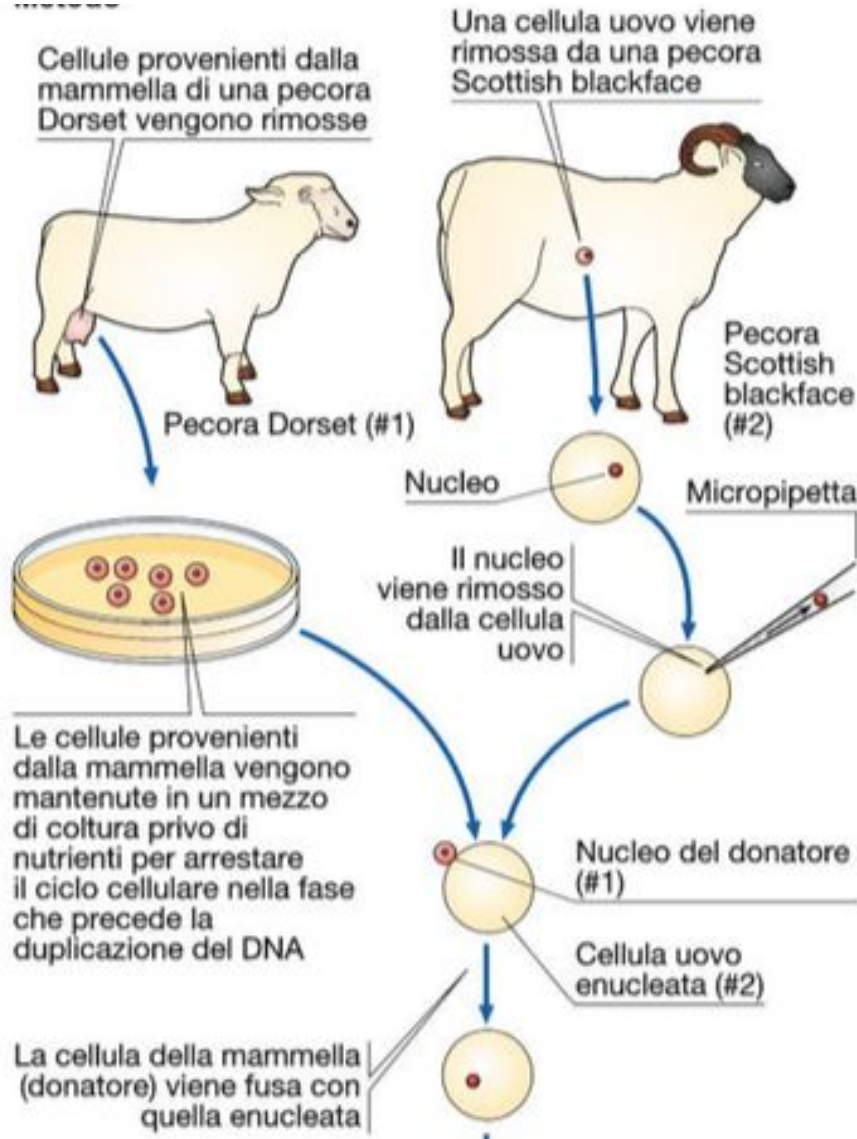
- 1952 (Briggs - King): uovo di rana (*Rana pipens*) e nucleo embrionale
- 1970 (Gurdon): uovo di rana (*Xenopus laevis*) e nucleo di girino
- 1997 (Wilmut): uovo di pecora e nucleo somatico: **Dolly**
- Dal 2000 sono stati clonati: macachi, topi, mucche, gatti, cavalli, pecore, capre, cammelli.

### Clonazione e manipolazione genica:

- Maiali transgenici con carni ricche di *omega-3*
- Salmone *AquAdvantage*, a crescita rapida



# 6. La clonazione di mammiferi

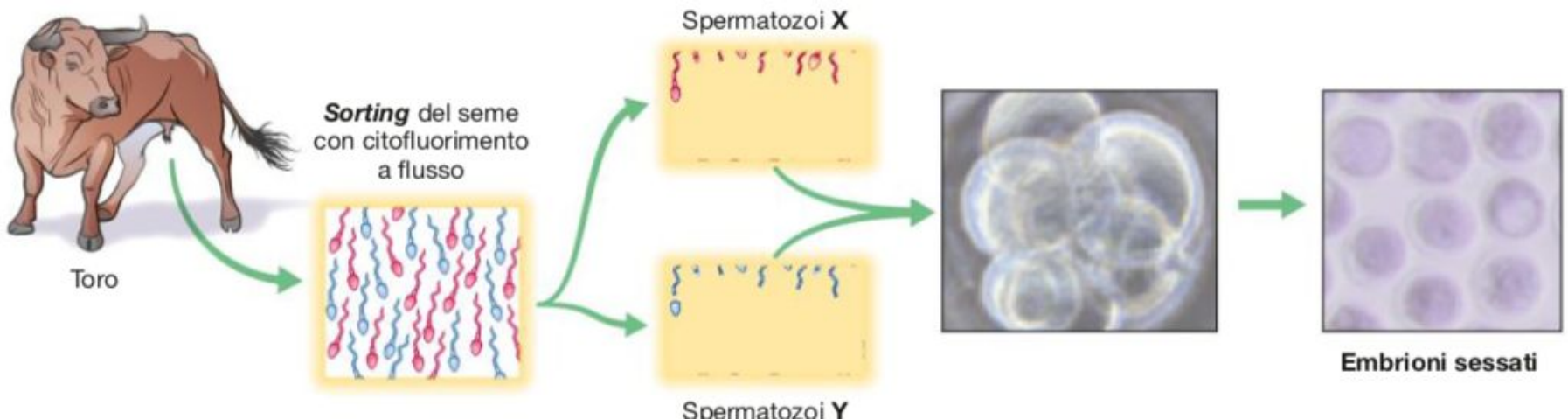


# 7. Il sessaggio del seme in zootecnia

**Cos'è:** selezione per la determinazione del sesso della progenie

**Come si fa:** si separano gli spermatozoi in base al differente contenuto in DNA tra spermatozoi Y e X (*citofluorimetria a flusso*)

**Applicazioni:** Programmazione di strategie riproduttive più efficaci ed economicamente redditizie



# 8. La micropropagazione agraria

**Cos'è:** produzione di cloni da piccole parti della pianta

## **Fasi:**

- espianto e sterilizzazione
- impianto
- proliferazione e allungamento
- radicazione
- acclimatazione

## **Terreni di coltura**

pH: 5-6

Contengono:

- sali minerali
- vitamine
- ormoni (auxine, citochinine, gibberelline)

## **Applicazioni:**

- Riproduzione di piante da frutto/fiori/orticole
- Selezione di varianti nuove/migliori a seguito di mutazioni spontanee (*variabilità somatica clonale*)

## 9. L'inquinamento ambientale e il biorisanamento

**Bioremediation:** utilizzo di microrganismi in grado di degradare inquinanti tossici per la bonifica di suolo e acqua.

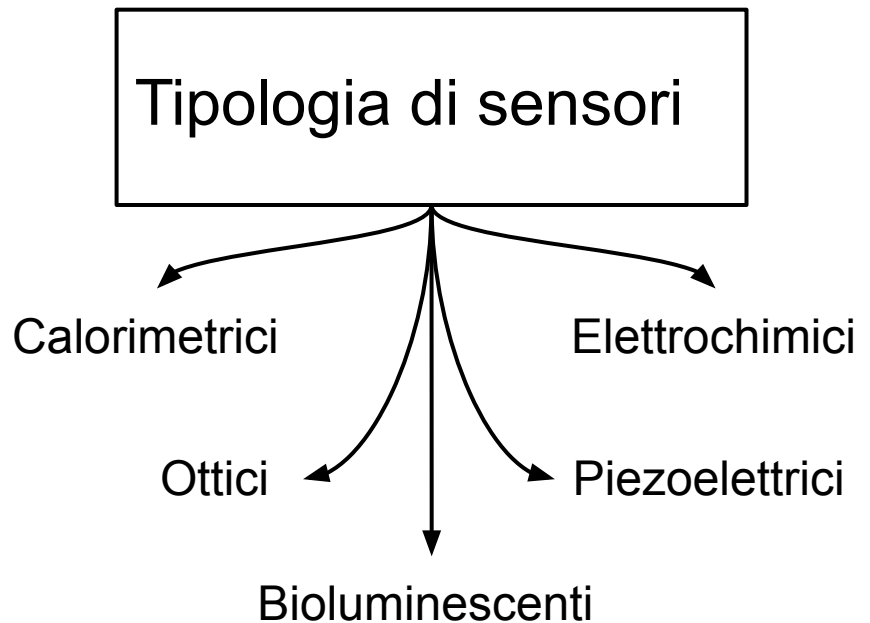
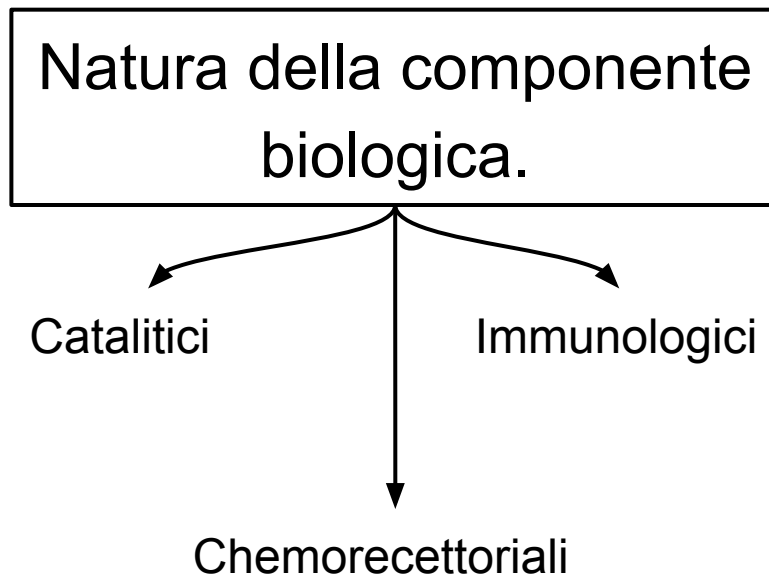
Ad esempio, *Pseudomonas putida F1* è dotato di **plasmidi catabolici** in grado di degradare benzene, toluene, etilbenzene (anche xilene, se geneticamente modificato).

Inoltre, è possibile modificare geneticamente i microrganismi inserendo geni per la sintesi di enzimi catabolici, affinché possano degradare più inquinanti contemporaneamente.

# 10. I biosensori: classificazione e usi

**Biosensore:** strumento in cui una componente biologica è connessa o integrata con un trasduttore di segnale

## Tipi



# 10. I biosensori: classificazione e usi

## Esempi

### **Biosensori per il controllo delle acque**

*Mosselmonitor*: sistema che registra il movimento dei bivalvi (cozze), che in condizioni di allarme restano chiuse per 4-5 minuti.

### **Biosensori per il dosaggio di pesticidi**

*Enzima acetilcolinesterasi su nanoparticelle di Nichel*: l'enzima catalizza una reazione di ossidoriduzione inibita dal pesticida organo fosforico; il sensore misura l'attività residua dell'enzima.

# 11. Le tecniche per lo studio delle popolazioni microbiche

**Scopo:** Comprendere il ruolo ecologico delle specie e indagare le attività metaboliche

- **Analisi dell'RNA 16s**

L'RNA 16s è formato da una regione variabile da specie a specie, e una regione conservata che muta con bassa frequenza, e che permette di identificare un batterio fino al livello di genere e specie.

- ***Next generation sequencing (NGS)***

Metodo di sequenziamento che permette di analizzare campioni misti e identificare tutti i batteri presenti.