

**TECNOLOGIA DEL
DNA RICOMBINANTE
(INGEGNERIA
GENETICA)**

**LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE
COMPRENDE TUTTE LE METODICHE CHE
PERMETTONO DI LAVORARE SUGLI ACIDI
NUCLEICI E MANIPOLARLI PER
STUDIARNE O UTILIZZARNE LE
PROPRIETÀ .**

E' una tecnologia che permette ad es di studiare il genoma e il trascrittoma umano, di far produrre farmaci per l'uomo nelle piante e nei batteri, di diagnosticare precocemente alcune malattie...

Come è possibile isolare e studiare un singolo gene da una molecola completa di DNA?

PURIFICAZIONE DEGLI ACIDI

NUCLEICI: isolamento e separazione dagli altri costituenti cellulari

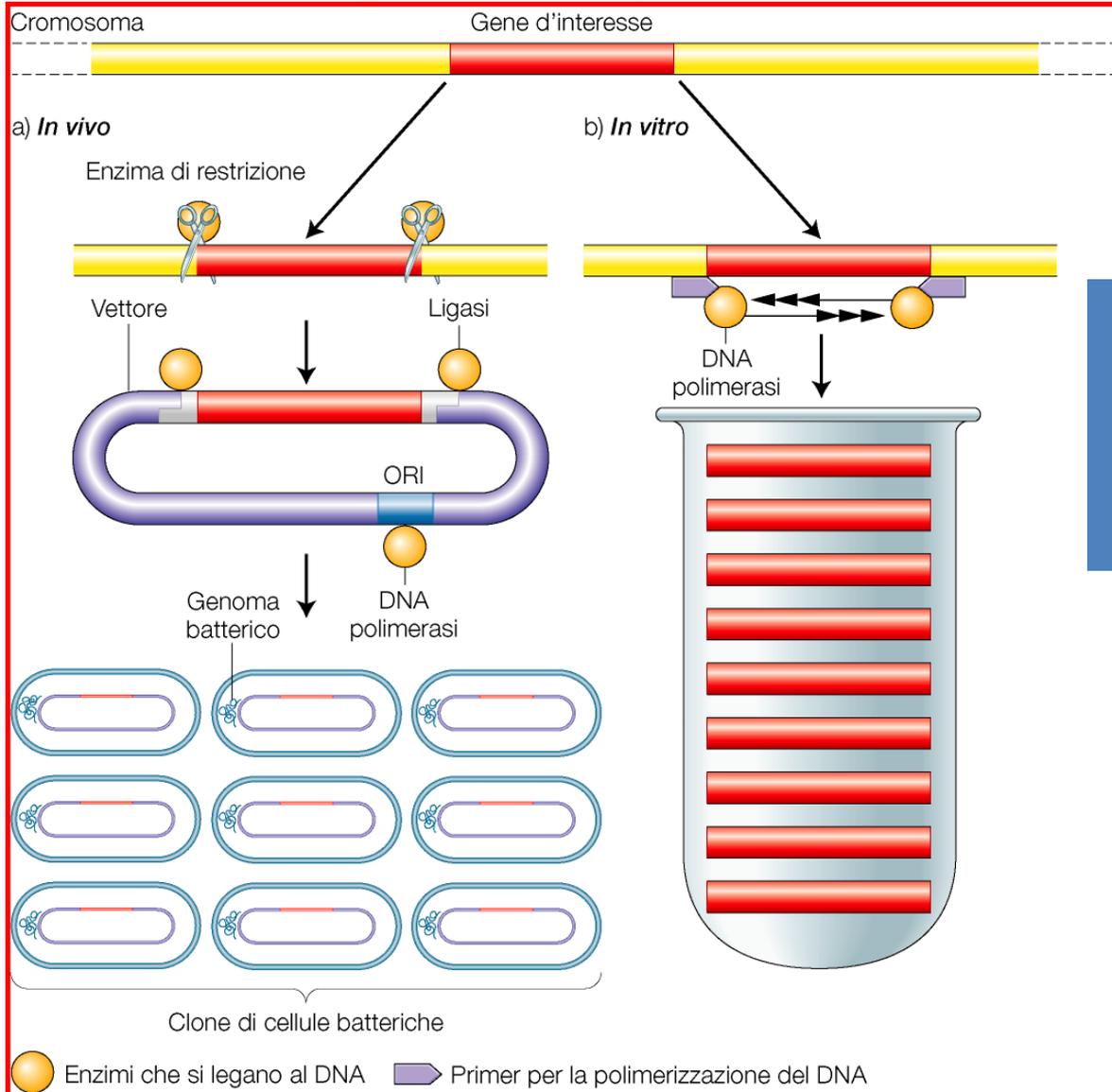


- OMOGENIZZAZIONE DEL TESSUTO E LISI CELLULARE
- DEPROTEINIZZAZIONE
- SEPARAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI TRA LORO

Dagli acidi nucleici purificati e' possibile isolare e amplificare specifiche sequenze di DNA (specifici geni)

In vivo
(1973)

**CLONAGGIO
GENICO**



In vitro
(1983)

**PCR
(polymerase
chain
reaction)**

CLONAGGIO GENICO

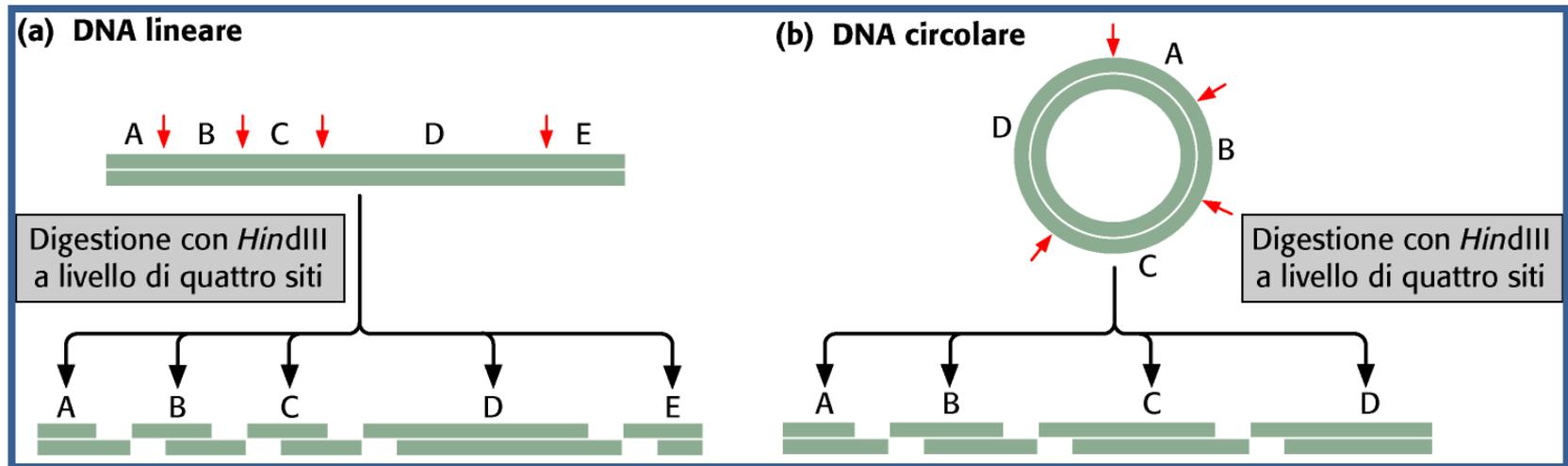
1. Isolamento del frammento di DNA di interesse (DNA genomico, cDNA)
2. Unione del frammento di DNA al **vettore di clonaggio**
3. Trasferimento del vettore ricombinante alla **cellula ospite**
4. Identificazione delle cellule che contengono la molecola ricombinante

CLONAGGIO:

1. ISOLAMENTO DEL FRAMMENTO DI INTERESSE: GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

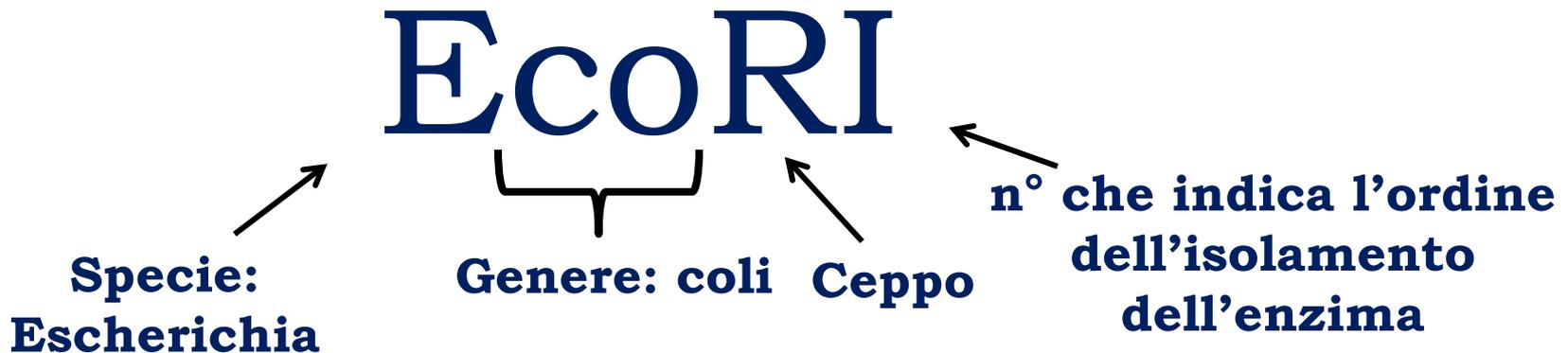
Sono endonucleasi di origine batterica che riconoscono una determinata sequenza di pochi nucleotidi (**SITO DI RESTRIZIONE**) e tagliano il DNA in maniera PRECISA E RIPRODUCIBILE

UNA LUNGA MOLECOLA DI DNA VIENE TAGLIATA IN FRAMMENTI DI DIMENSIONI PRECISAMENTE DEFINITE



GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

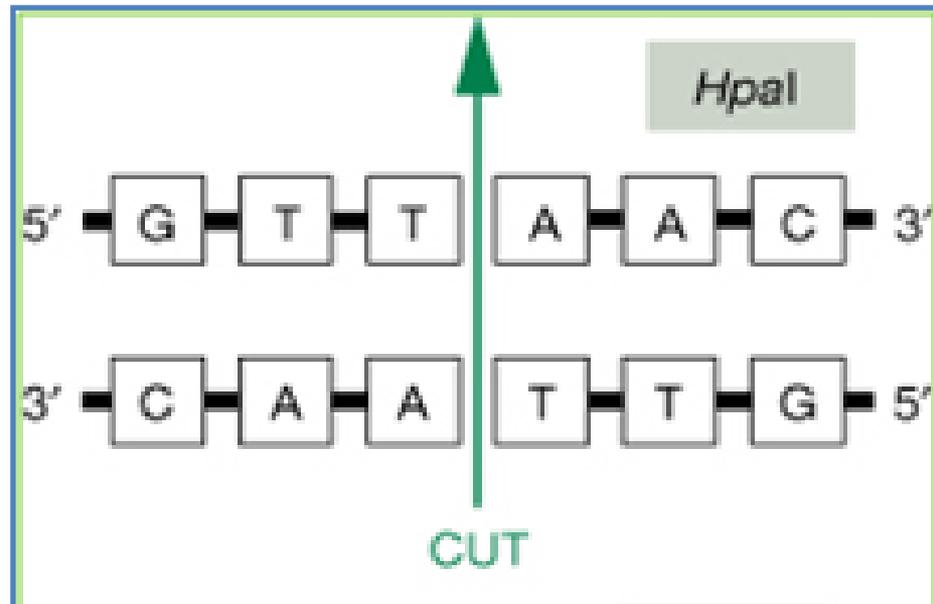
SPECIE DIVERSE DI BATTERI PRODUCONO
ENZIMI DI RESTRIZIONE DIVERSI CON
DIFFERENTI SPECIFICITA' DI SEQUENZA



GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE PROTEGGONO I
BATTERI DAI VIRUS FRAMMENTANDO IL
GENOMA VIRALE

GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

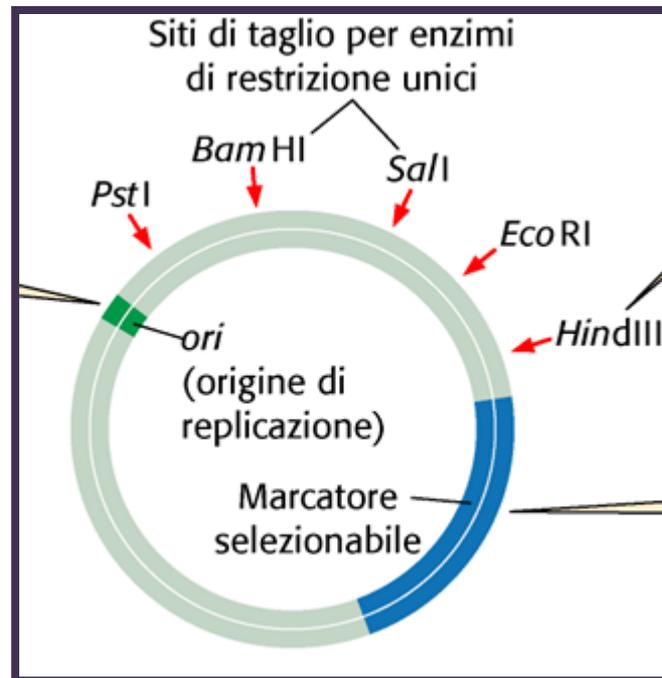
LE SEQUENZE RICONOSCIUTE (SITI DI RESTRIZIONE) SONO IN GENERE **PALINDROMI** DI 4-6 NUCLEOTIDI; L'ENZIMA TAGLIA SU QUESTE O NELLE VICINAZZE



CLONAGGIO:

2. INSERZIONE DEL FRAMMENTO IN UN VETTORE

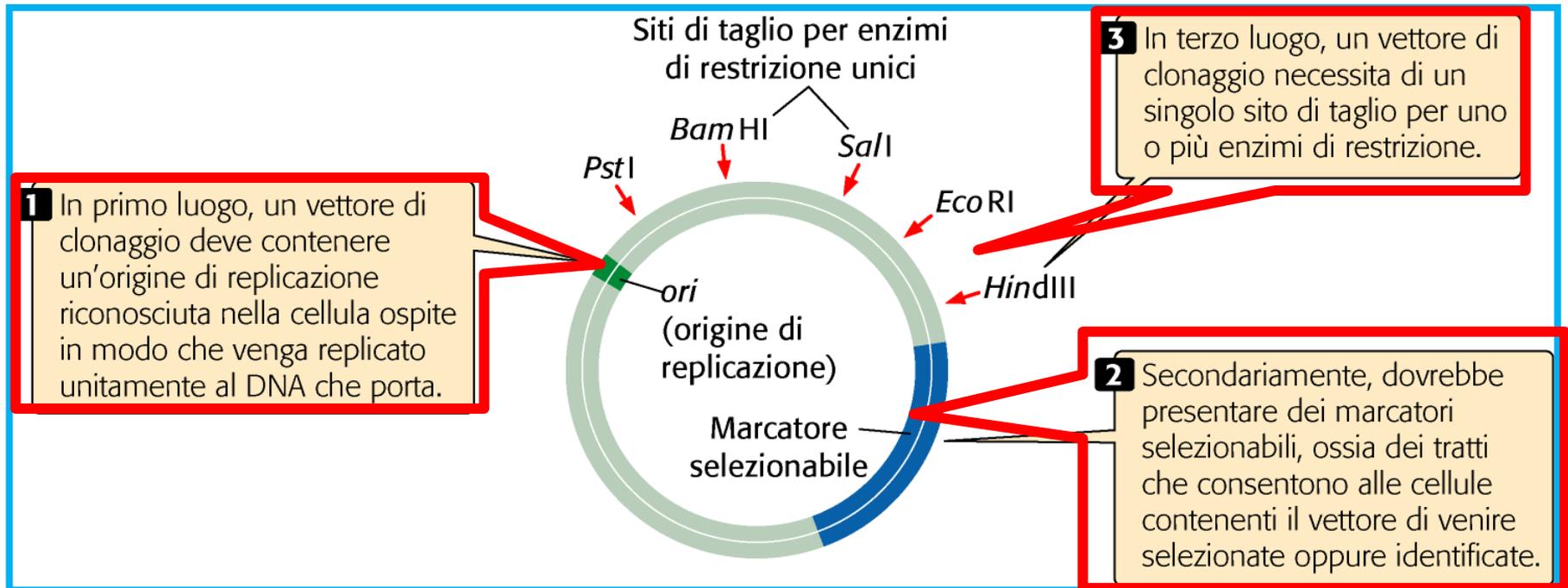
I **VETTORI** sono molecole di DNA in grado di veicolare il frammento di interesse in cellule ospiti opportune (batteri, lieviti...), che replicandosi producono un gran numero di copie del gene stesso



CLONAGGIO:

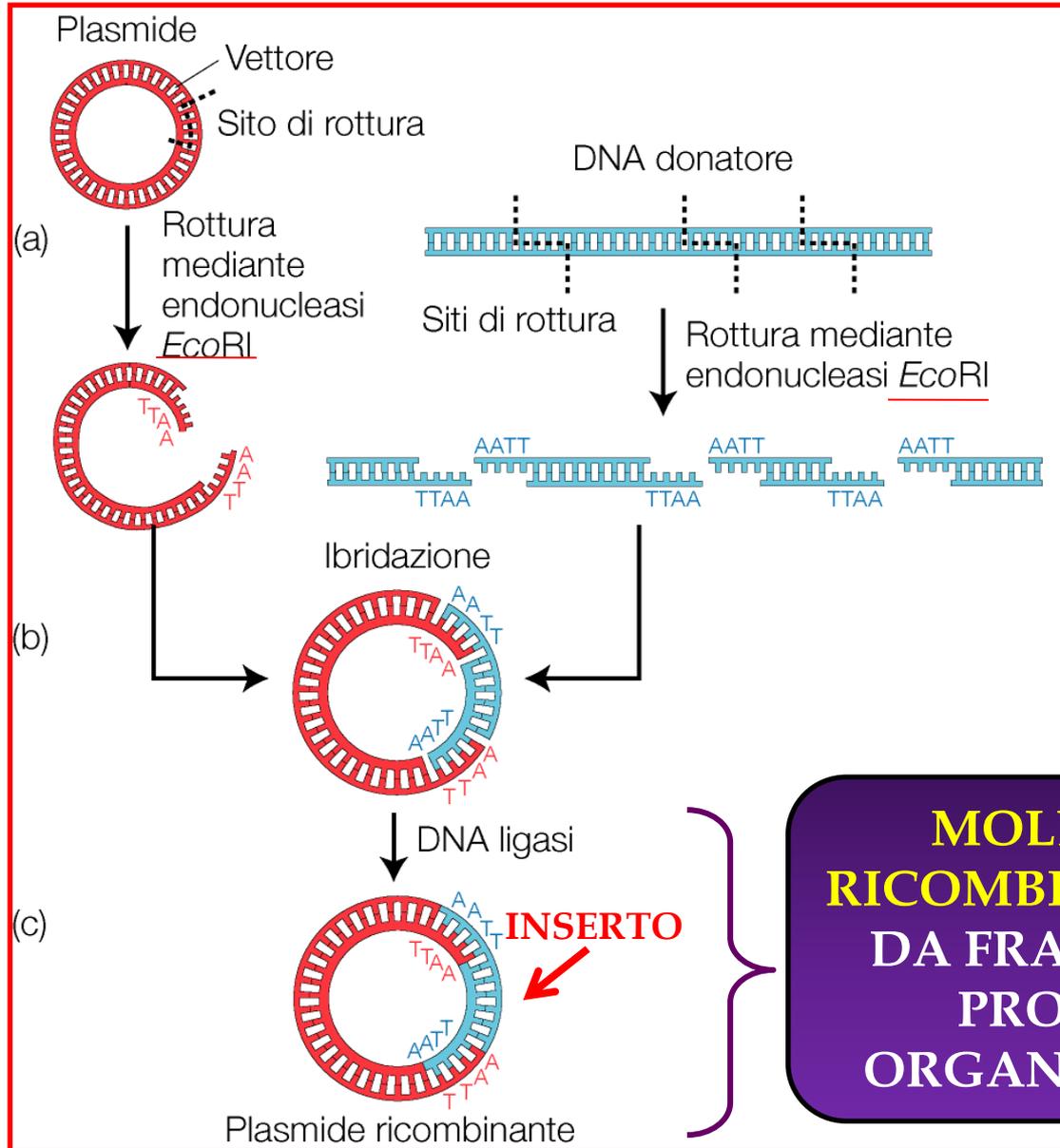
2. INSERZIONE DEL FRAMMENTO IN UN VETTORE

I VETTORI PIÙ COMUNI SONO I **VETTORI PLASMIDICI** SONO FONDAMENTALI TRE CARATTERISTICHE:



CLONAGGIO:

2. INSERZIONE DEL FRAMMENTO IN UN VETTORE

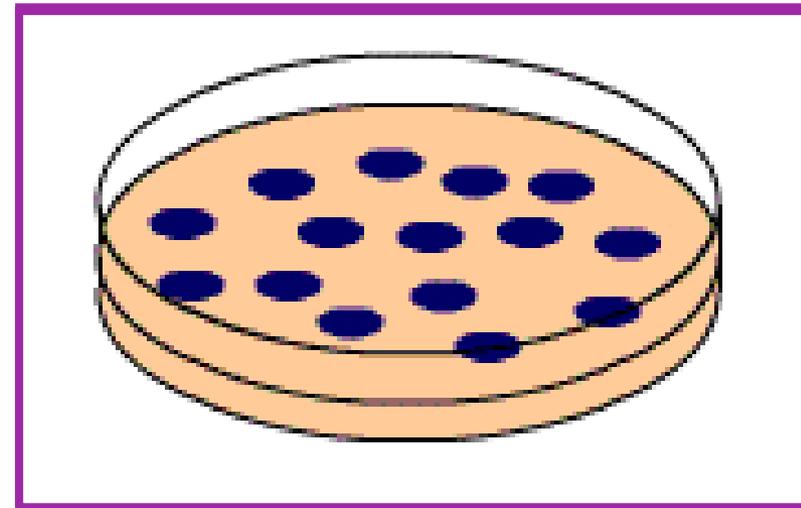
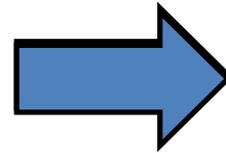
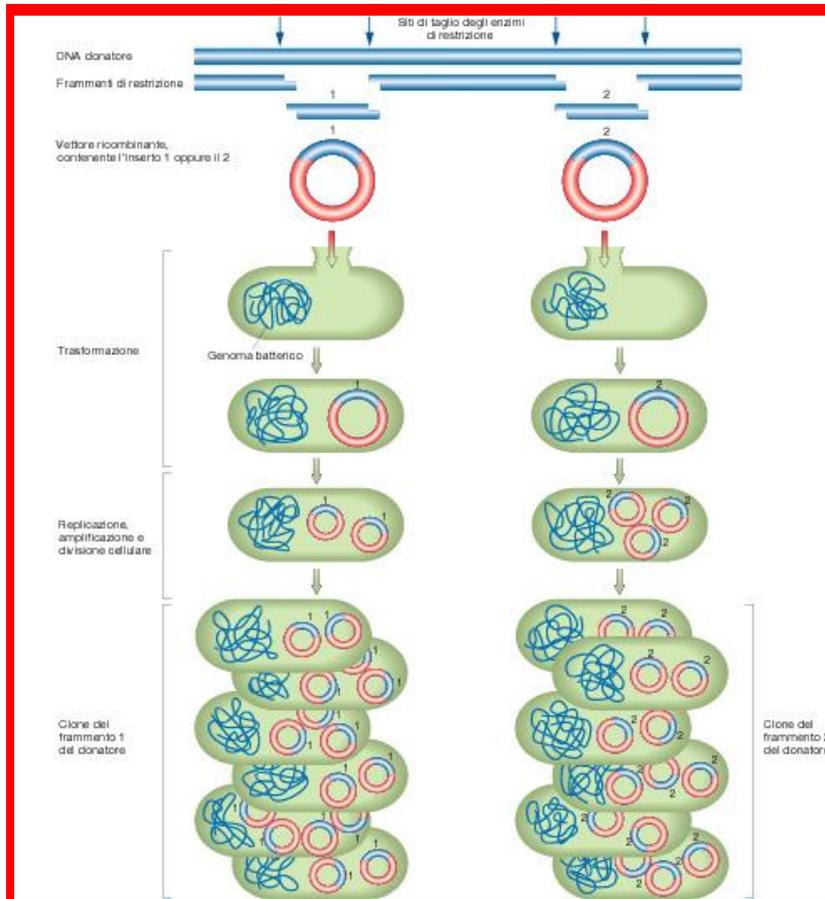


**MOLECOLA DI DNA
RICOMBINANTE: FORMATA
DA FRAMMENTI DI DNA
PROVENIENTI DA
ORGANISMI DIFFERENTI**

CLONAGGIO:

3. TRASFERIMENTO DEL VETTORE RICOMBINANTE IN UNA CELLULA OSPITE (in genere *E.coli*)

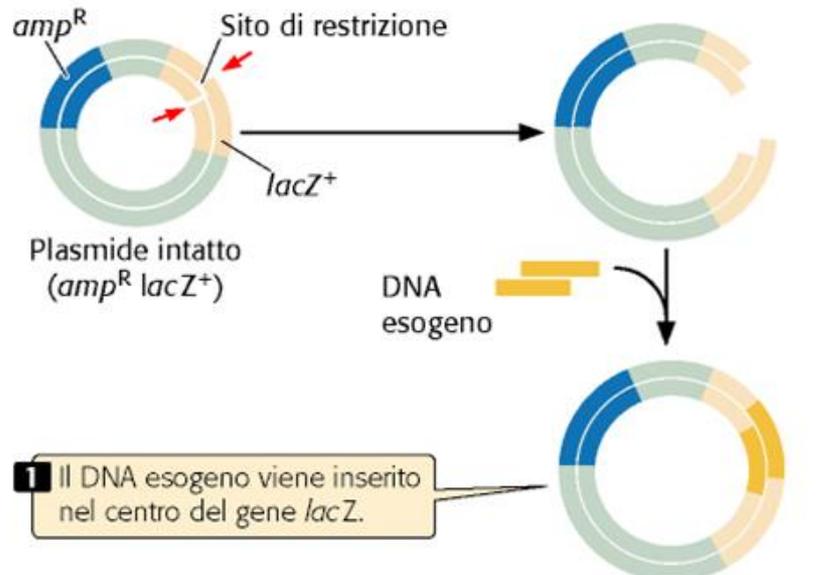
TRASFORMAZIONE (plasmide)



**COLONIE
BATTERICHE**

CLONAGGIO:

4. IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE CONTENENTI IL VETTORE



1 Il DNA esogeno viene inserito nel centro del gene *lacZ*.

Plasmide ricombinante (*amp^R lacZ⁻*)

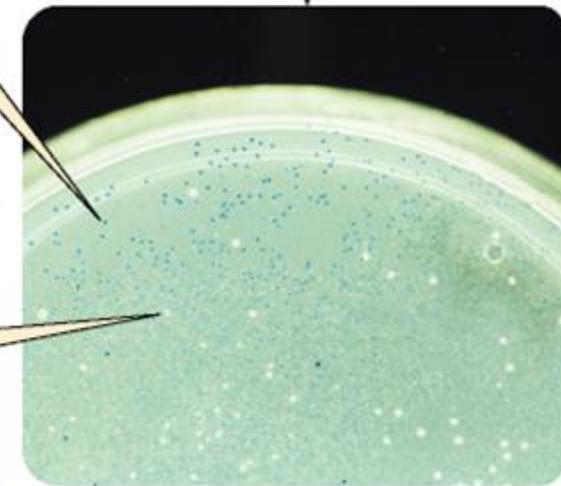
Trasformazione di batteri *lacZ⁻*



Piastrare su terreno con ampicillina e X-gal

4 I batteri che mostrano il plasmide intatto produrranno β -galattosidasi, che scinde l'X-gal colorando di blu le colonie.

5 I batteri contenenti il plasmide ricombinante non sintetizzano la β -galattosidasi; le loro colonie rimarranno bianche.



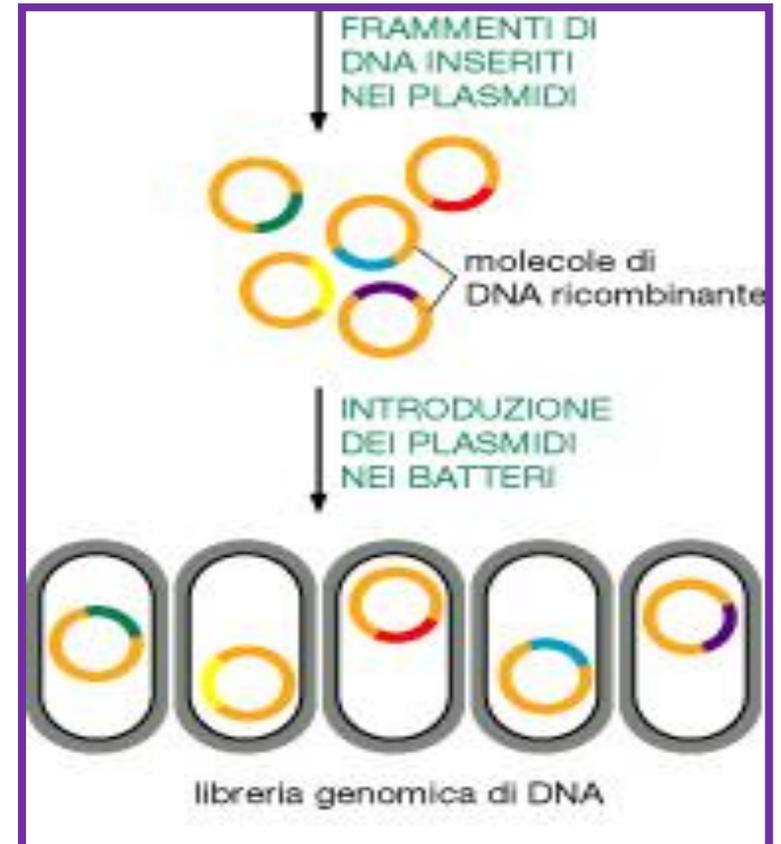
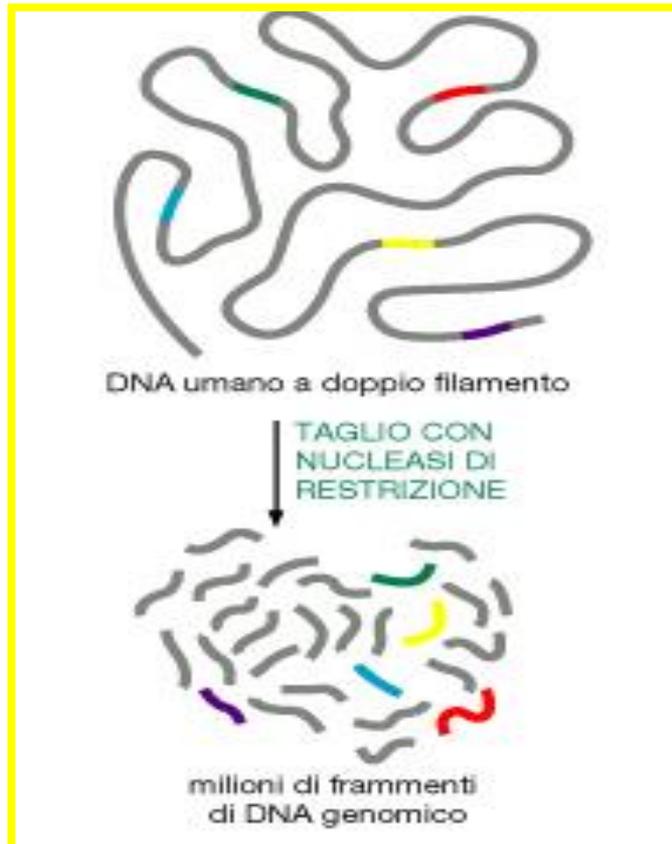
Conclusion: Una colonia bianca è formata da batteri che portano il plasmide ricombinante.

2 I batteri *lacZ⁻* vengono trasformati dal plasmide e piastrati su terreno contenente ampicillina.

3 I batteri che non contengono il plasmide non si svilupperanno.

COSTRUZIONE DI UNA LIBRERIA GENOMICA (GENOTECA)

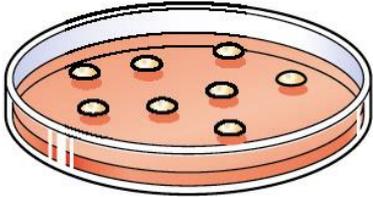
COLLEZIONE DI CLONI BATTERICI O DI ALTRI ORGANISMI CONTENENTI CIASCUNO UN FRAMMENTO DI DNA GENOMICO PURIFICATO DA UN TESSUTO O DA UNA COLTURA CELLULARE



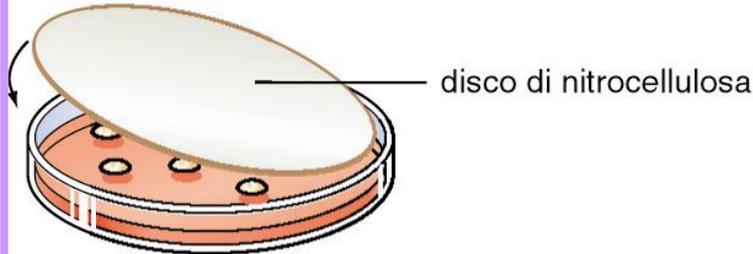
COSTRUZIONE DI UNA LIBRERIA GENOMICA (GENOTECA)

SI DISPONE DI TUTTO IL GENOMA DI UN ORGANISMO FRAMMENTATO DA CUI SI POSSONO ISOLARE I GENI DI INTERESSE

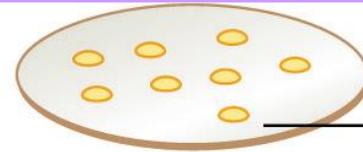
piastra principale con la libreria genomica formata da cloni genomici di topo



si copre con un disco di nitrocellulosa per fare una replica della piastra



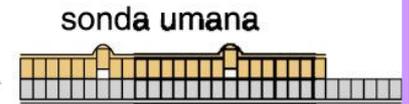
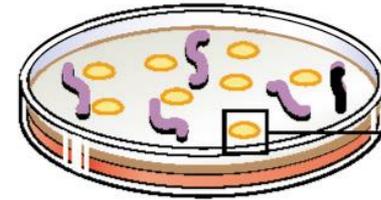
si rimuove il disco dalla piastra, si lisano le cellule che si sono trasferite e si denatura il DNA con NaOH. Si scalda e si tratta con gli UV per far aderire i filamenti di DNA al disco



replica sul disco

sequenze della fibrosi cistica umana marcate

si aggiunge la sonda marcata. Le colonie con sequenze di DNA complementari ibridano con la sonda e la trattengono

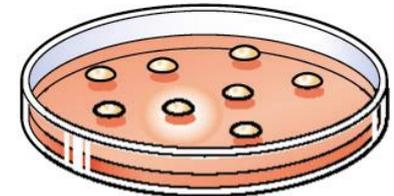
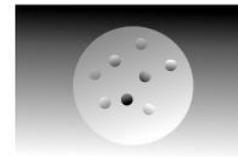


sonda umana

gene del topo

piastra originale

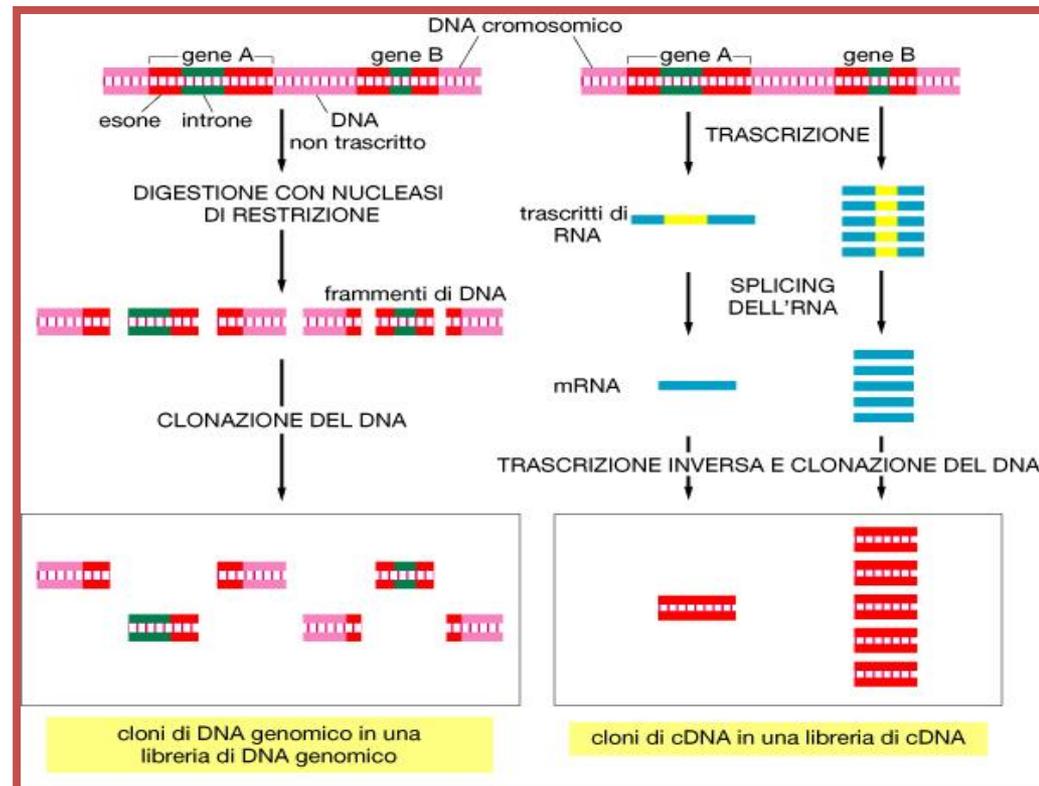
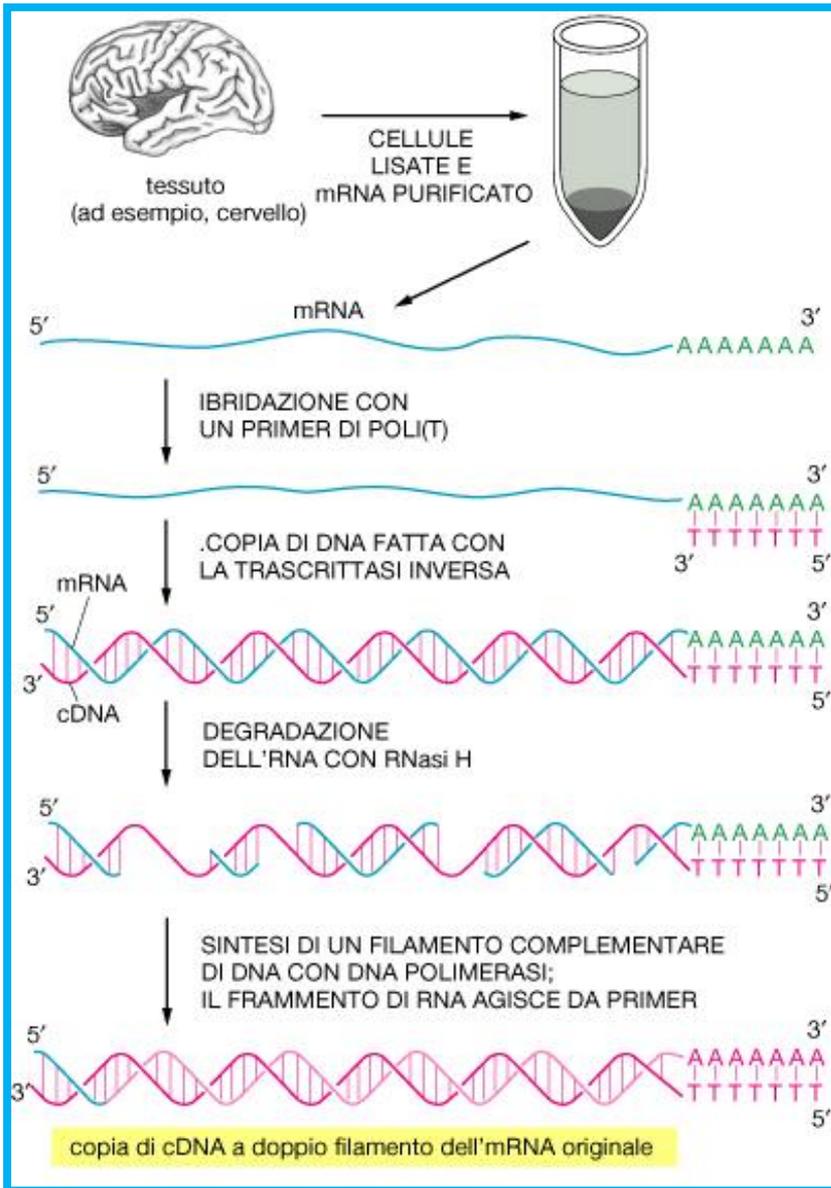
si lava il disco, si espone a una pellicola per raggi X



si confronta il risultato con la piastra originaria per identificare il clone batterico con il frammento genomico desiderato

LIBRERIA DI cDNA (D'ESPRESSIONE)

collezione di cloni che include tutte le specie di mRNA (copiate in cDNA) espresse in un dato tessuto: tessuto specifica



Polymerase Chain Reaction (PCR)

La **Reazione a catena della Polimerasi** è una tecnica di biologia molecolare che consente la copiatura ripetitiva di uno **specifico** tratto di DNA



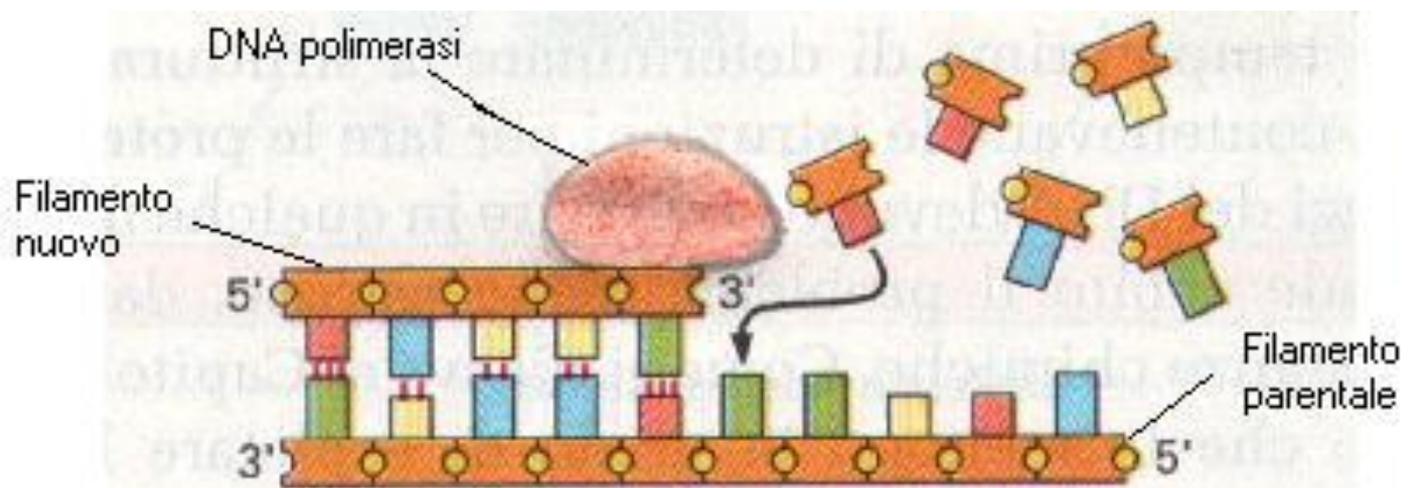
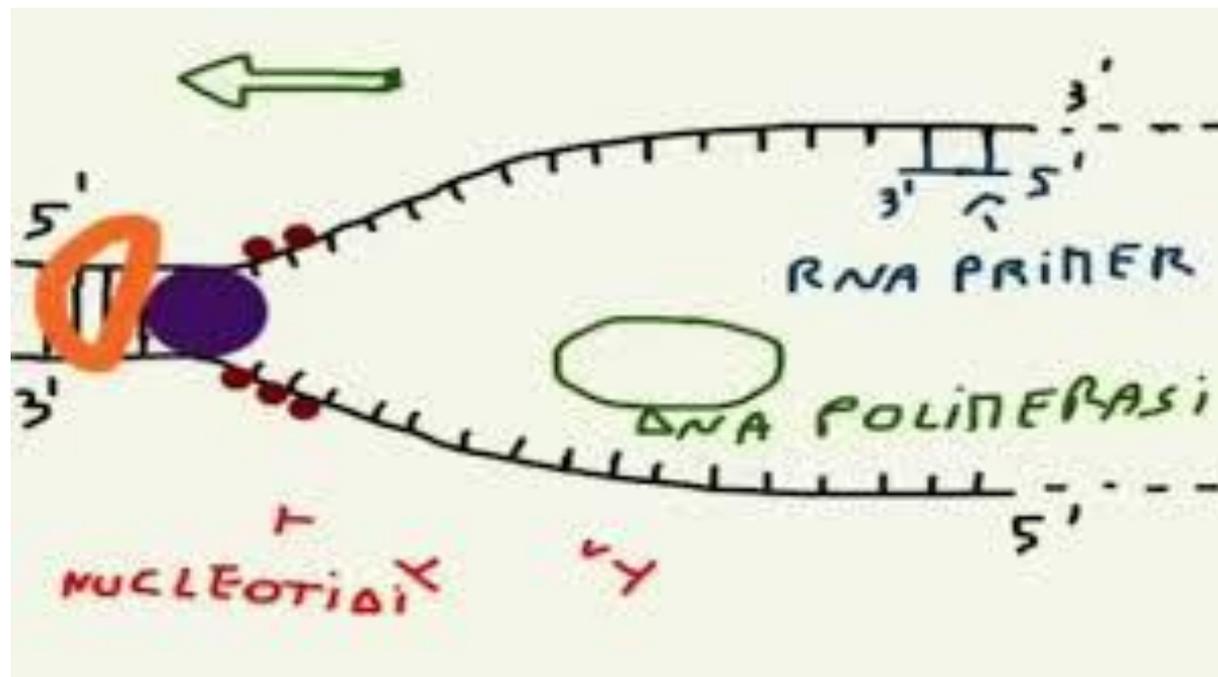


**SI TRATTA DI UN'ESTENSIONE
DEL PROCESSO DI
REPLICAZIONE DEL DNA**

LA DUPLICAZIONE DEL DNA E' SEMICONSERVATIVA

- I due filamenti si separano
- Ciascun filamento fa da stampo per il filamento complementare
- Ciascuna nuova molecola di DNA è costituita da un filamento parentale (IN BLU) ed uno neosintetizzato (IN GIALLO)



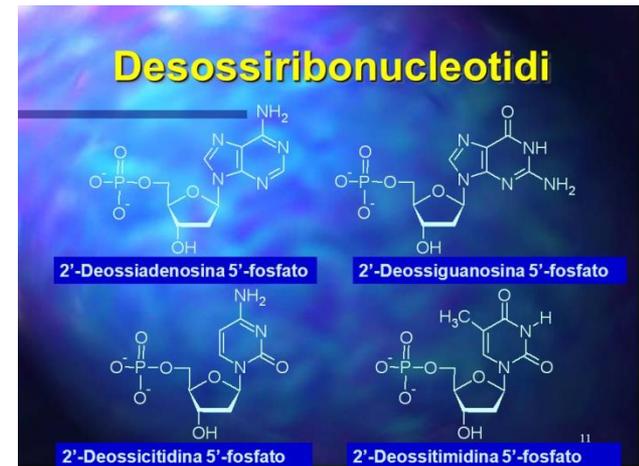




DNA



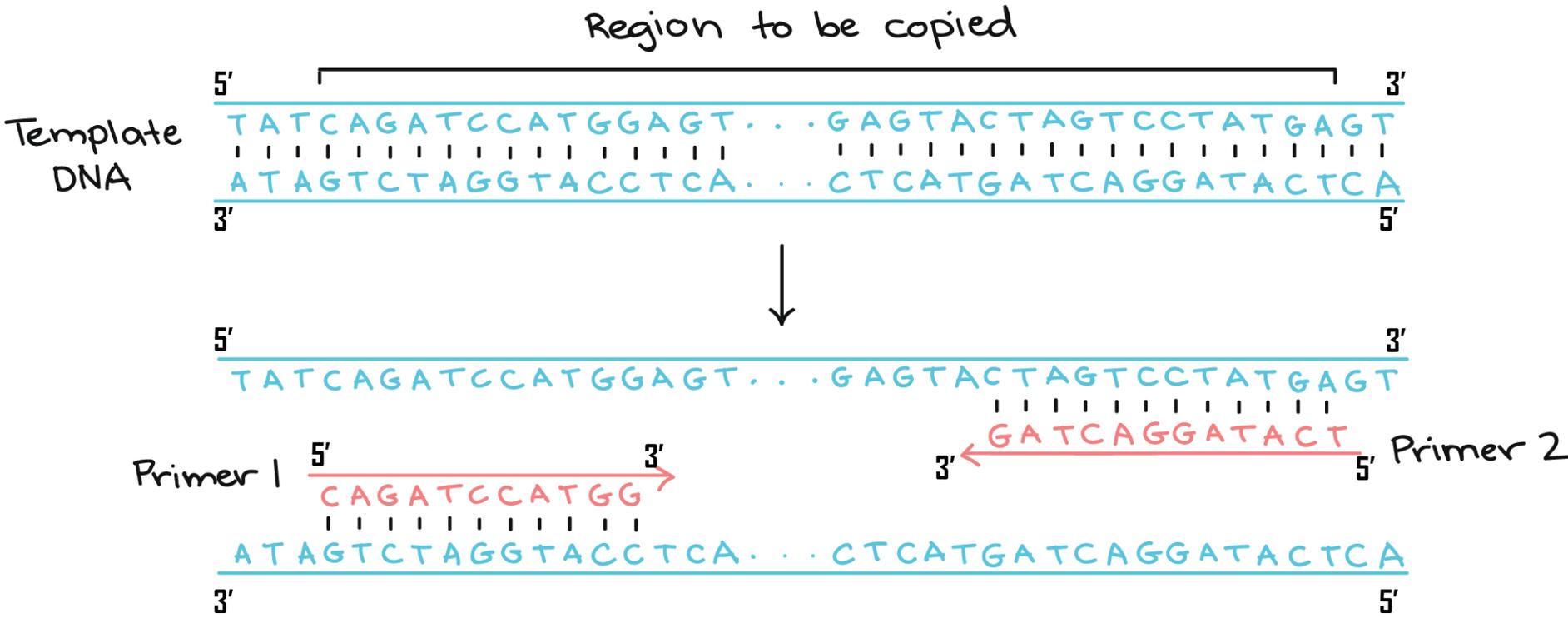
**Desossiribonucleotidi
(dNTPs)**



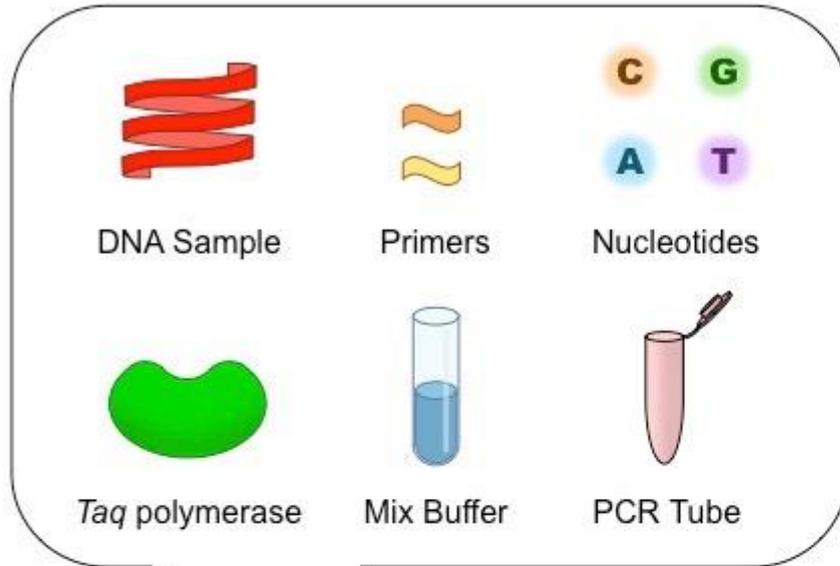
DNA polimerasi



In questo modo, all'interno della regione definita, il primer di sinistra (**Forward** o **sense**) dirige la sintesi del filamento complementare verso destra, ed il primer di destra (Reverse o **antisense**) verso sinistra



PCR Components

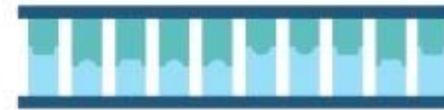


Thermal Cycler



PCR Cycle

PCR Process (ONE Cycle)



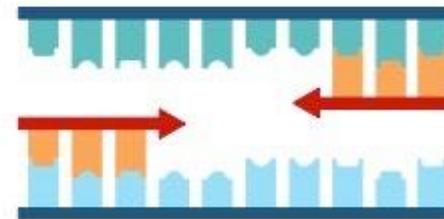
95°C – Strands separate

1. Denaturing



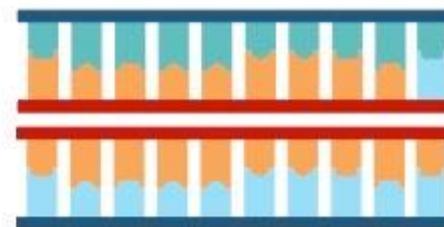
55°C – Primers bind template

2. Annealing



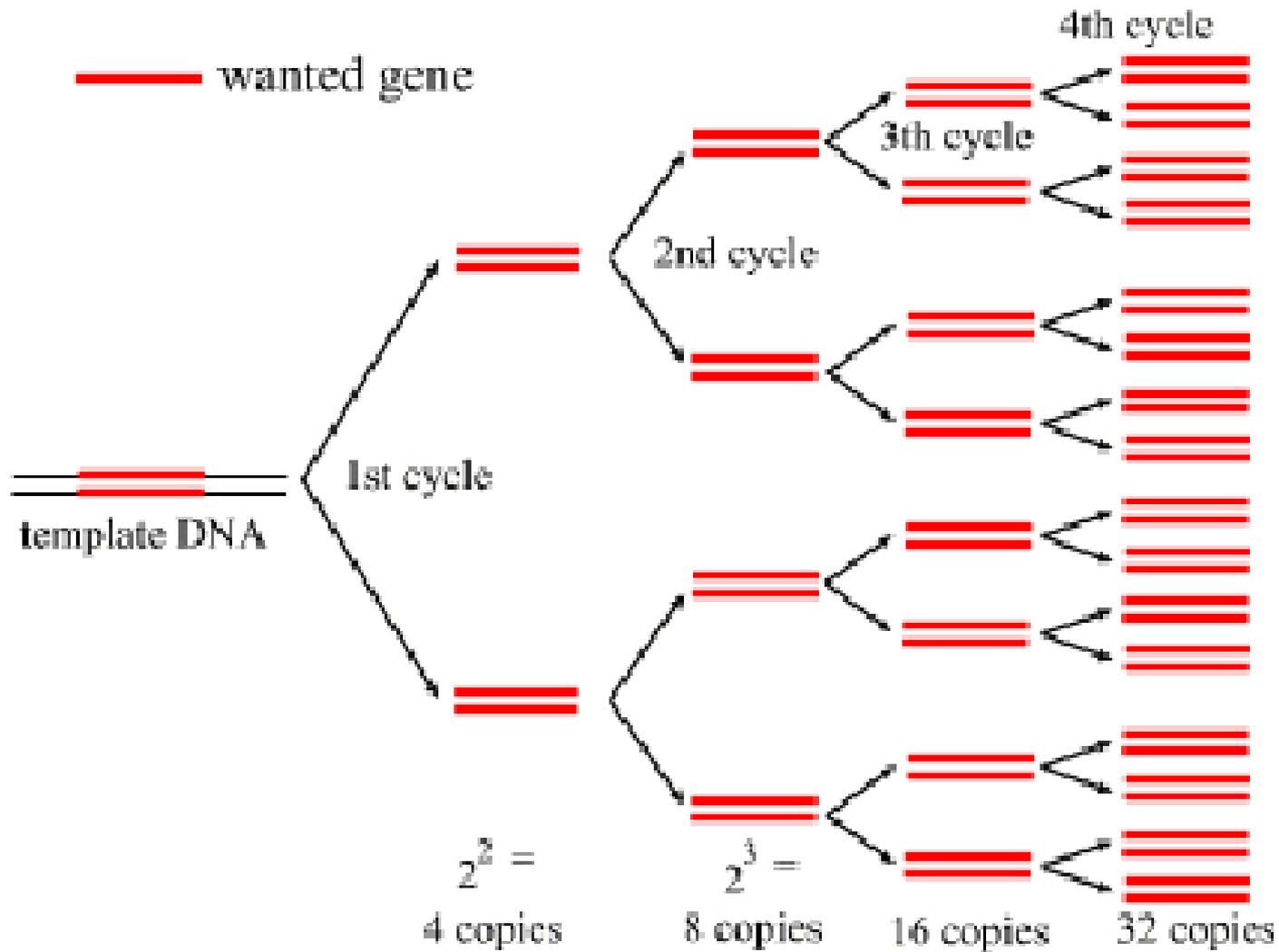
72°C – Synthesis new strand

3. Extension



Klenow (DNA polimerasi di E. coli T ottimale 37°C)

Taq polimerasi termoresistente



30 cicli

Da 1 singola molecola di DNA → 10^9

TERMOCICLATORE PROGRAMMABILE



IN ESSI LE PROVETTE CONTENENTI LA MISCELA DI REAZIONE SONO POSTE IN BLOCCHI DI METALLO RISCALDABILI E LE VARIE FASI DI UN CICLO (TEMPERATURA E DURATA) COSI' COME IL NUMERO DI RIPETIZIONE DEL CICLO SONO PROGRAMMABILI MEDIANTE UN PICCOLO COMPUTER INCORPORATO

DNA STAMPO

QUALSIASI TIPO DI DNA

❖ DNA GENOMICO

❖ DNA PLASMIDICO

❖ DNA DI VIRUS

❖ **cDNA** = DNA complementare ad un mRNA, sintetizzato utilizzando la trascrittasi inversa in un processo noto come **RETROTRASCRIZIONE, RT)**

LE APPLICAZIONI IN AMBITO MEDICO

LA DIAGNOSI GENETICA

INDAGINI PRE- E POST-NATALI PER LA PRESENZA DI ANOMALIE GENETICHE (mutazioni genetiche causa di malattie monogeniche a trasmissione mendeliana)

RILEVAMENTO DI INFEZIONI DA PATOGENI

INDAGINE MEDICO-LEGALE

TEST DI PATERNITA'

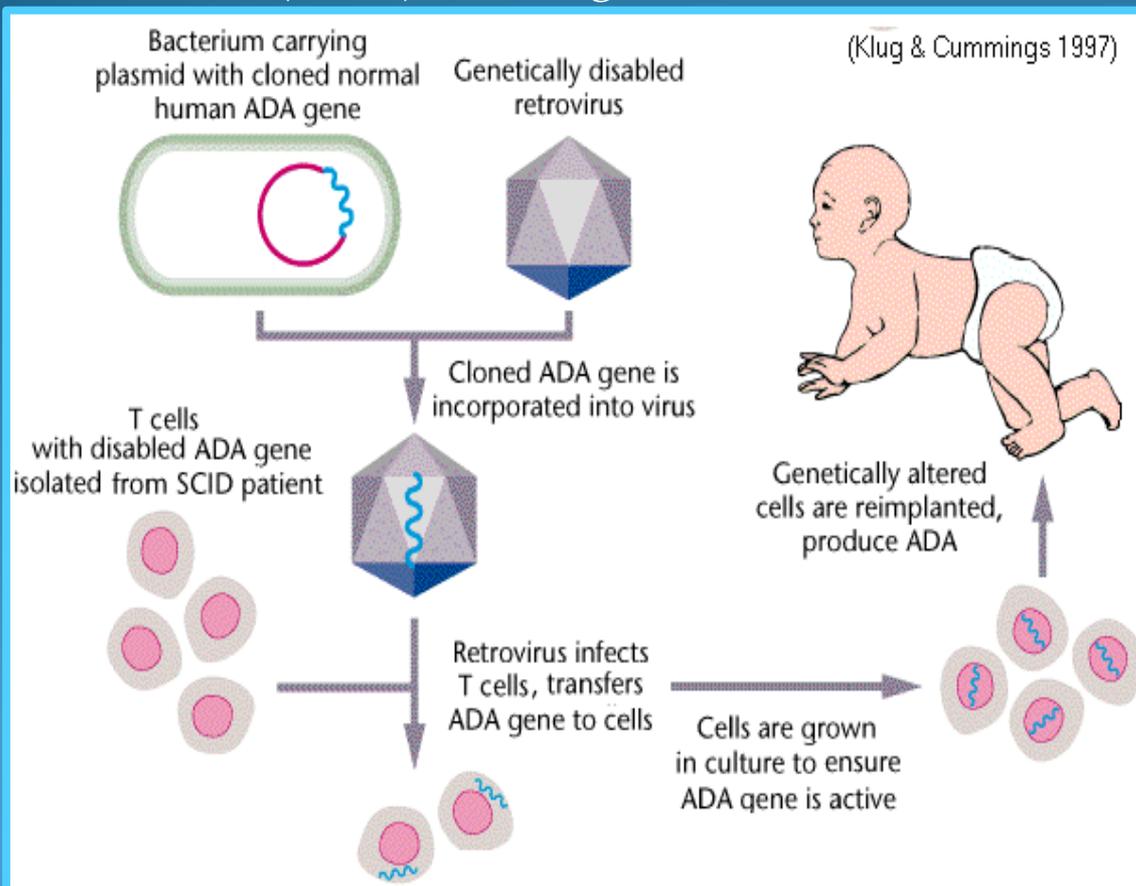
IL GENOMA ALL'INTERNO DI UNA SPECIE E' POLIMORFICO

POLIMORFISMO: ESISTENZA, IN UNA POPOLAZIONE (>1%), DI DUE O PIU' VARIANTI ALLELICHE DI UN GENE (PER LO PIU' VARIANTI DI SEQUENZA NON PATOLOGICHE)

TERAPIA GENICA :

sostituzione della versione difettosa di un gene con una funzionante all'interno di un organismo, in modo da rimediare alla malattia genetica.

1990 primo esperimento: sostituzione del gene mutato per adenosina-deaminasi (ADA) con un gene funzionale in individuo affetto da SCID



Immunodeficienze severe combinate (SCID), malattie in cui il sistema immunitario è gravemente compromesso, al punto che l'organismo è incapace di difendersi dagli agenti infettivi.

PRODUZIONE DI ORGANISMI TRANSENICI (OGM).

INTRODUZIONE, IN CELLULE GERMINALI
DI PIANTE E ANIMALI O IN CELLULE
BATTERICHE, DI UN GENE ESTRANEO
(TRANSGENE) CHE CONFERISCE
ALL'ORGANISMO IN TOTO
CARATTERISTICHE NUOVE

Es:

- produzione di piante transgeniche resistenti a insetti o fitopatogeni
- produzione di organismi transgenici per la produzione di farmaci o vaccini

PRODUZIONE DI ORGANISMI TRANSENICI (OGM).

PRODUZIONE
DI INSULINA
UMANA IN
BATTERI
TRANSGENICI A
LIVELLO
INDUSTRIALE

