Tecniche di Biologia Molecolare

Concetti chiave

• In laboratorio gli acidi nucleici possono essere tagliati a livello di sequenze ben precise utilizzando gli enzimi di restrizione.

• I frammenti di acido nucleico si possono separare in base alla loro dimensione utilizzando l'elettroforesi.

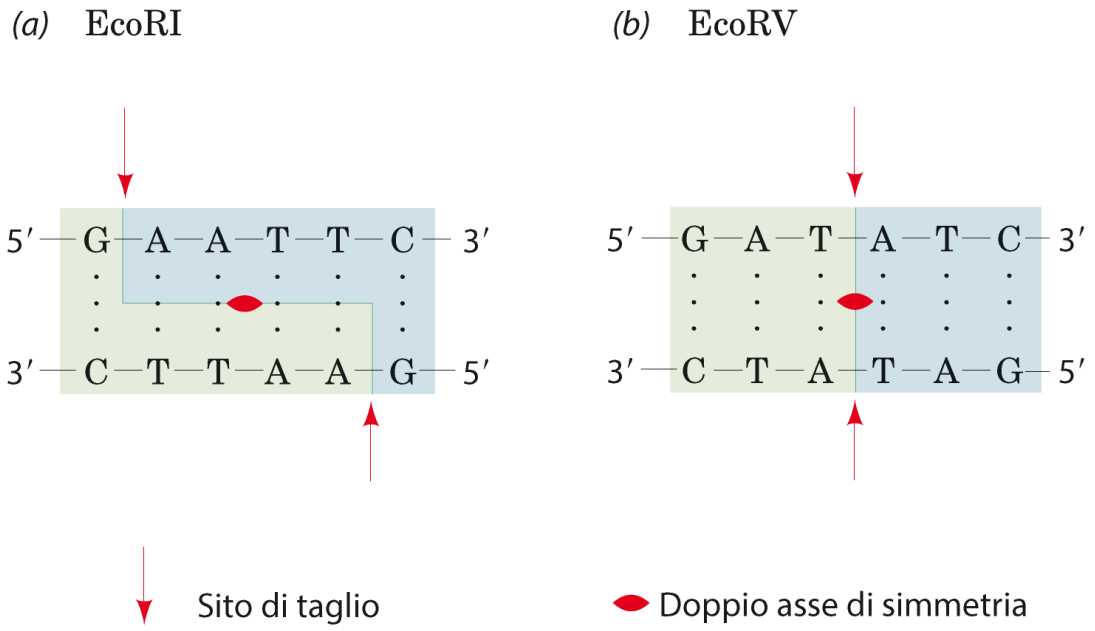
• Il genoma umano contiene circa 23 000 geni, corrispondenti a circa l'1,2% dei suoi 3 miliardi di nucleotidi.

• Le differenze esistenti tra le sequenze rivelano i cambiamenti evolutivi.

Gli Enzimi di Restrizione Batterici

Le endonucleasi di restrizione batteriche scindono il DNA eterologo (come quello dei virus infettanti) ma lasciano immodificato il proprio DNA che è metilato in presenza dei potenziali siti di riconoscimento.

Sono note più di 100 endonucleasi di restrizione disponibili oggi commercialmente. I loro nomi derivano da un'abbreviazione a tre lettere che indica l'organismo di appartenenza.
Eco per *E. coli,* Hin per *Haemophilus influenzae* e Hae per *H. aegyptius*) seguito dall'indicazione del ceppo e dal numero romano (se vi è più di un enzima di restrizione prodotto dallo stesso organismo).



Le endonucleasi di restrizione tagliano a livello di siti di riconoscimento specifici

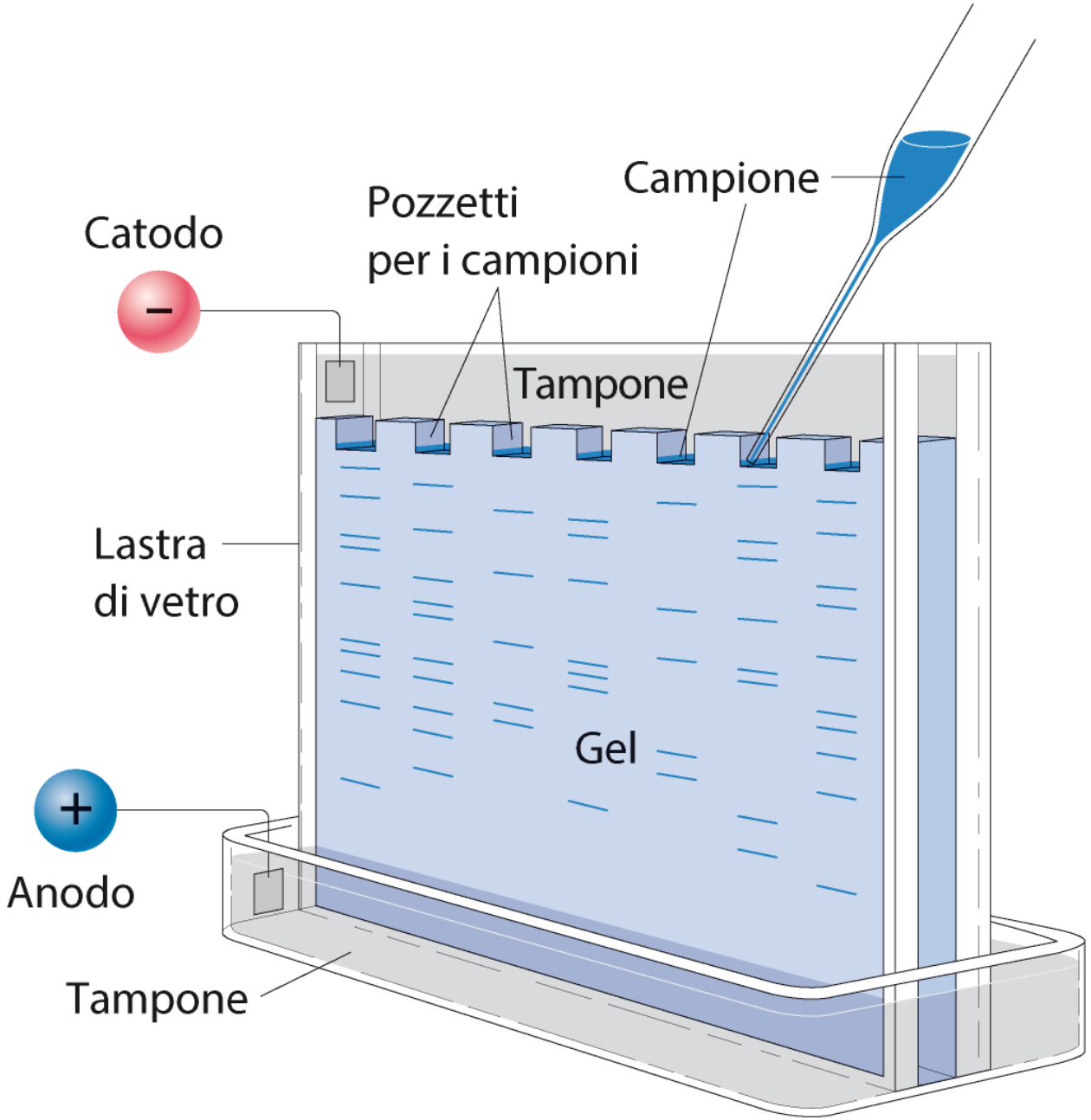
TABELLA 3.2 Siti di riconoscimento e di taglio di alcuni enzimi di restrizione

Enzima	Sequenza di riconoscimento[a]	Microrganismo
AluI	AG↓CT	*Arthrobacter luteus*
BamHI	G↓GATCC	*Bacillus amyloliquefaciens* H
BglII	A↓GATCT	*Bacillus globigii*
EcoRI	G↓AATTC	*Escherichia coli* RY13
EcoRII	↓CC(A/T)GG	*Escherichia coli* R245
EcoRV	GAT↓ATC	*Escherichia coli* J62 pLG74
HaeII	RGCGC↓Y	*Haemophilus aegyptius*
HaeIII	GG↓CC	*Haemophilus aegyptius*
HindIII	A↓AGCTT	*Haemophilus influenzae* R_d
HpaII	C↓CGG	*Haemophilus parainfluenzae*
MspI	C↓CGG	*Moraxella* species
PstI	CTGCA↓G	*Providencia stuartii* 164
PvuII	CAG↓CTG	*Proteus vulgaris*
SalI	G↓TCGAC	*Streptomyces albus* G
TaqI	T↓CGA	*Thermus aquaticus*
XhoI	C↓TCGAG	*Xanthomonas holcicola*

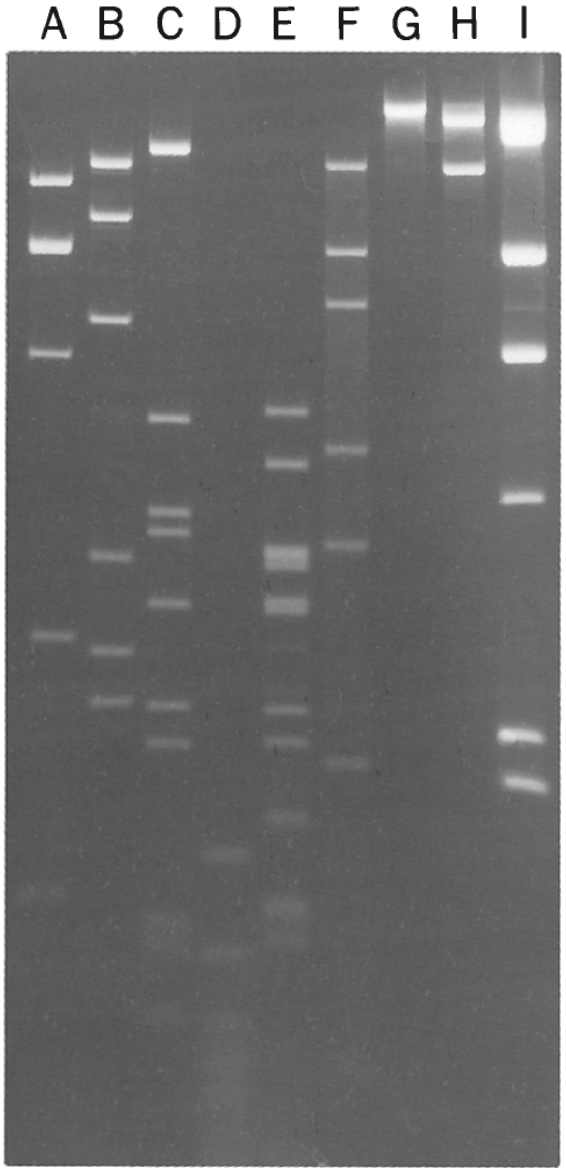
[a]La sequenza di riconoscimento è abbreviata; è indicato un solo filamento, scritto nella direzione da 5′ a 3′. Il sito di taglio è rappresentato dalla freccia (↓). R e Y indicano, rispettivamente, un nucleotide purinico e uno pirimidinico.

Fonte: Roberts, R. J., Macelis, D. REBASE (la banca dati degli enzimi di restrizione), http://rebase.neb.com.

Apparato per elettroforesi su gel



Elettroferogramma di prodotti digeriti per restrizione



Dimensioni dei genomi sequenziati

TABELLA 3.3 Alcuni dei genomi sequenziati

Organismo	Dimensioni del genoma (kb)	Numero di cromosomi
Mycoplasma genitalium (parassita umano)	580	1
Rickettsia prowazekii (presunta relazione con i mitocondri)	1112	1
Haemophilus influenzae (patogeno umano)	1830	1
Escherichia coli (simbionte umano)	4639	1
Saccharomyces cerevisiae (lievito per panificazione)	12 070	16
Plasmodium falciparum (protozoo responsabile della malaria)	23 000	14
Caenorhabditis elegans (nematode)	97 000	6
Arabidopsis thaliana (pianta dicotiledone)	119 200	5
Drosophila melanogaster (moscerino della frutta)	180 000	4
Oryza sativa (riso)	389 000	12
Danio rerio (pesce zebra)	1 700 000	25
Gallus gallus (pollo)	1 200 000	40
Mus musculus (topo)	2 500 000	20
Homo sapiens	3 038 000	23

Collegamento tra variazione della sequenza genica e patologia umana

TABELLA 3.4 Alcune malattie genetiche diagnosticabili con test di screening

Patologia	Sintomi
Atassia telangiectasia	Perdita del controllo motorio, immunodeficienza, accresciuto rischio di insorgenza del cancro
Beta talassemia	Grave anemia, crescita rallentata
Galattosemia	Disabilità mentale, danni agli organi
Malattia di Niemann-Pick	Perdita delle abilità motorie e intellettuali, accumulo di lipidi
Malattia di Tay-Sachs	Perdita delle abilità motorie e intellettuali, morte intorno ai 3 anni
Malattia di Usher	Sordità e perdita progressiva della vista

Il sequenziamento degli acidi nucleici

Punto di verifica

- Perché i frammenti più piccoli di DNA migrano più lontano durante le corse elettroforetiche?
- Riassumete le informazioni conosciute sulla dimensione e il contenuto genico del genoma umano.

La manipolazione del DNA

Concetti chiave

• I segmenti di DNA possono essere clonati o riprodotti in un organismo ospite.

• La reazione a catena della polimerasi amplifica un segmento di DNA sintetizzando ripetutamente filamenti complementari.

• La tecnologia del DNA ricombinante può essere utilizzata per manipolare geni per l'espressione di proteine o per la produzione di organismi transgenici.

Il plasmide pUC18

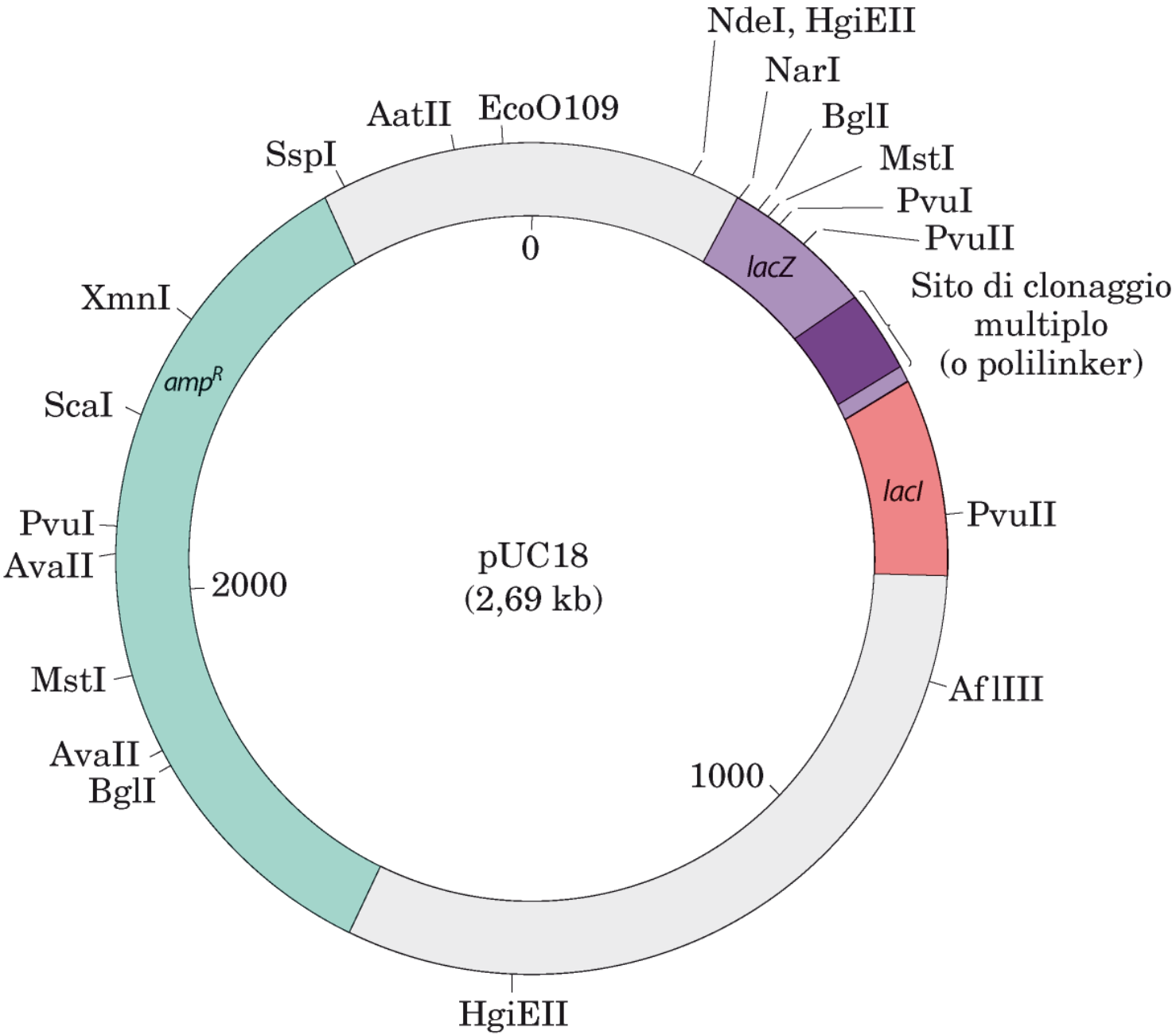


Diagramma di processo per la costruzione di una molecola di DNA ricombinante

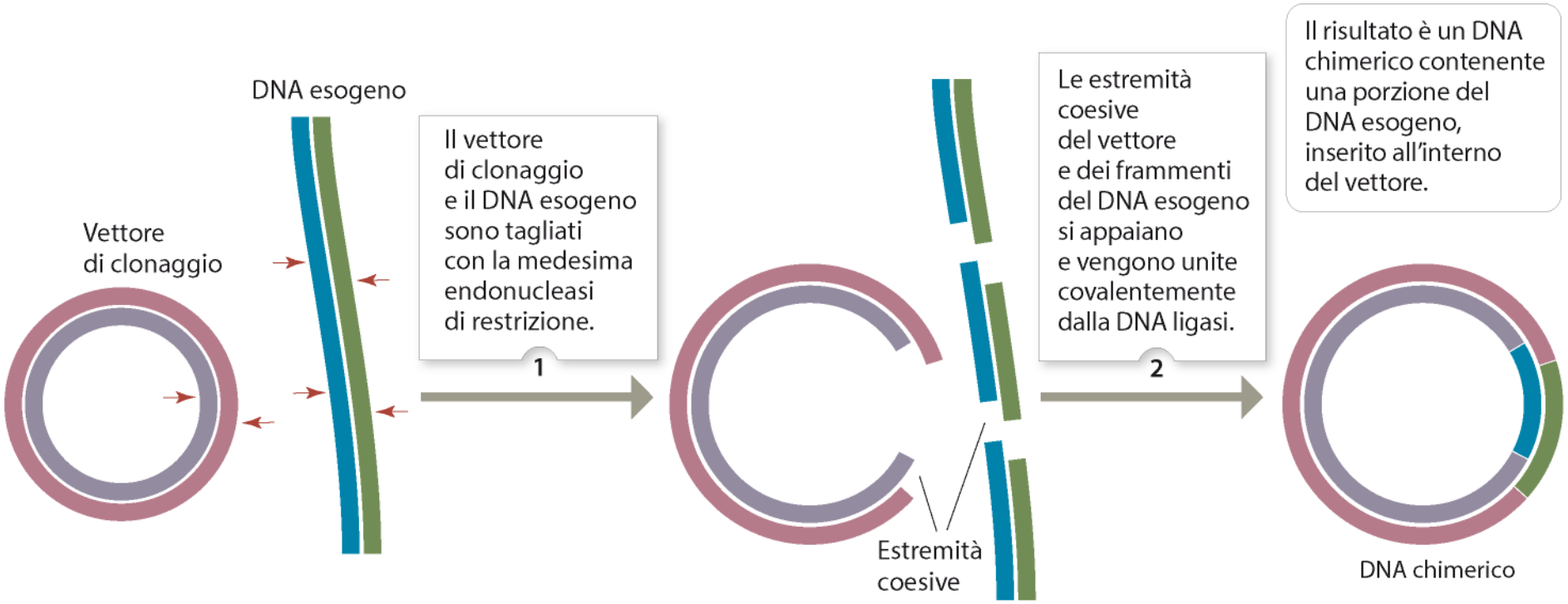


Diagramma di processo della reazione a catena della polimerasi (PCR)

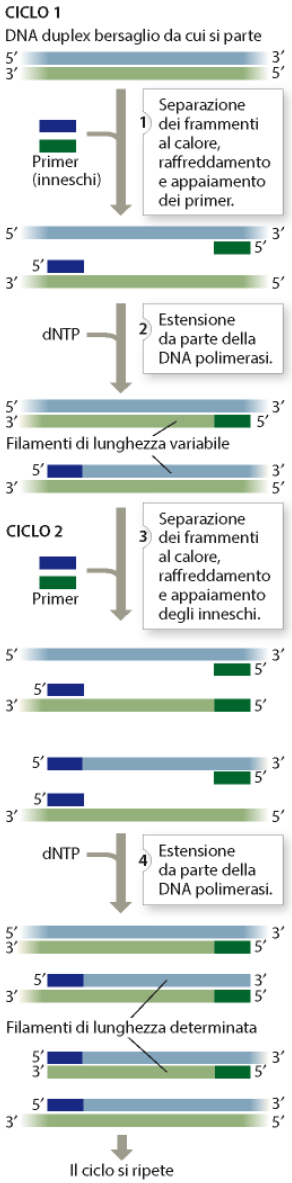


Diagramma di processo della reazione a catena della polimerasi (PCR)

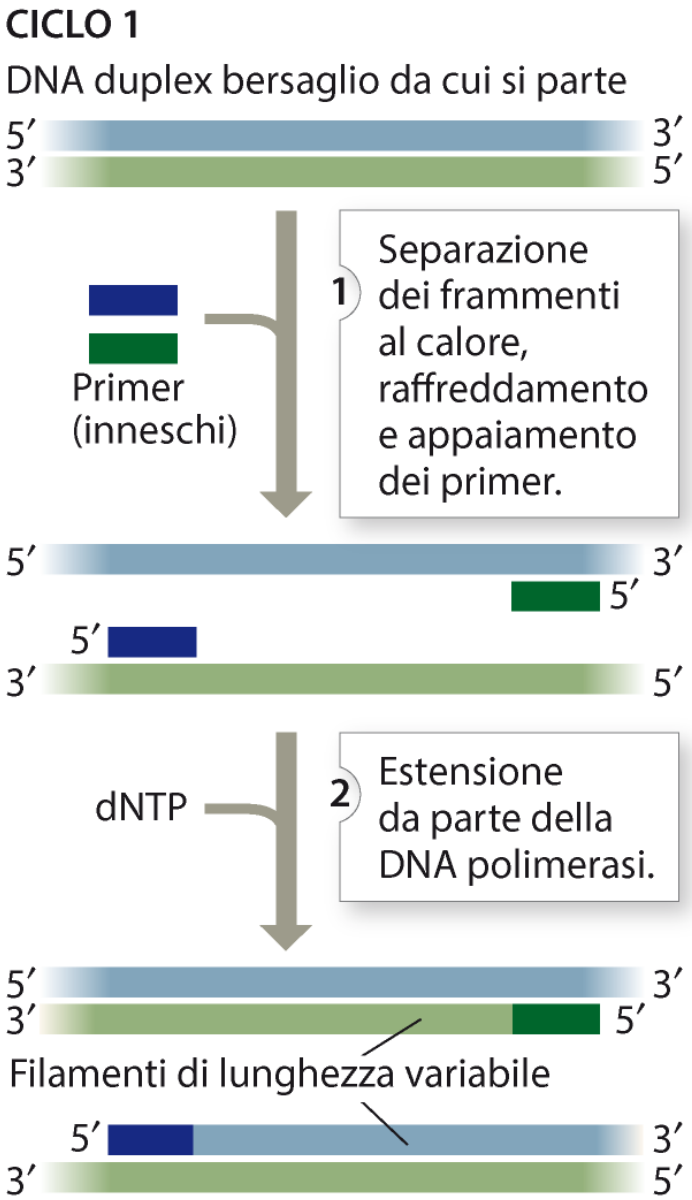
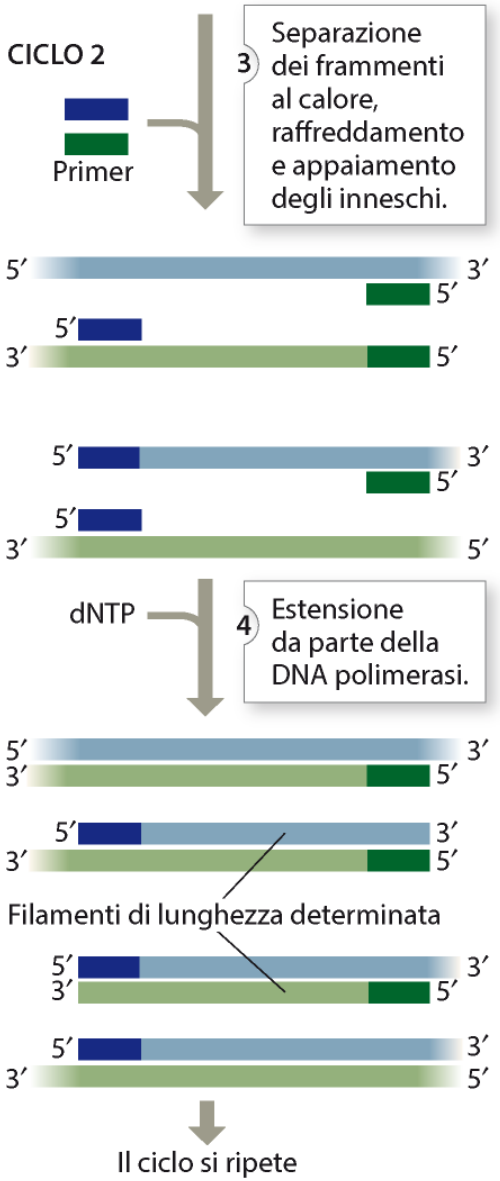


Diagramma di processo della reazione a catena della polimerasi (PCR)



Le proteine ricombinanti

TABELLA 3.5 Alcune proteine prodotte mediante ingegneria genetica

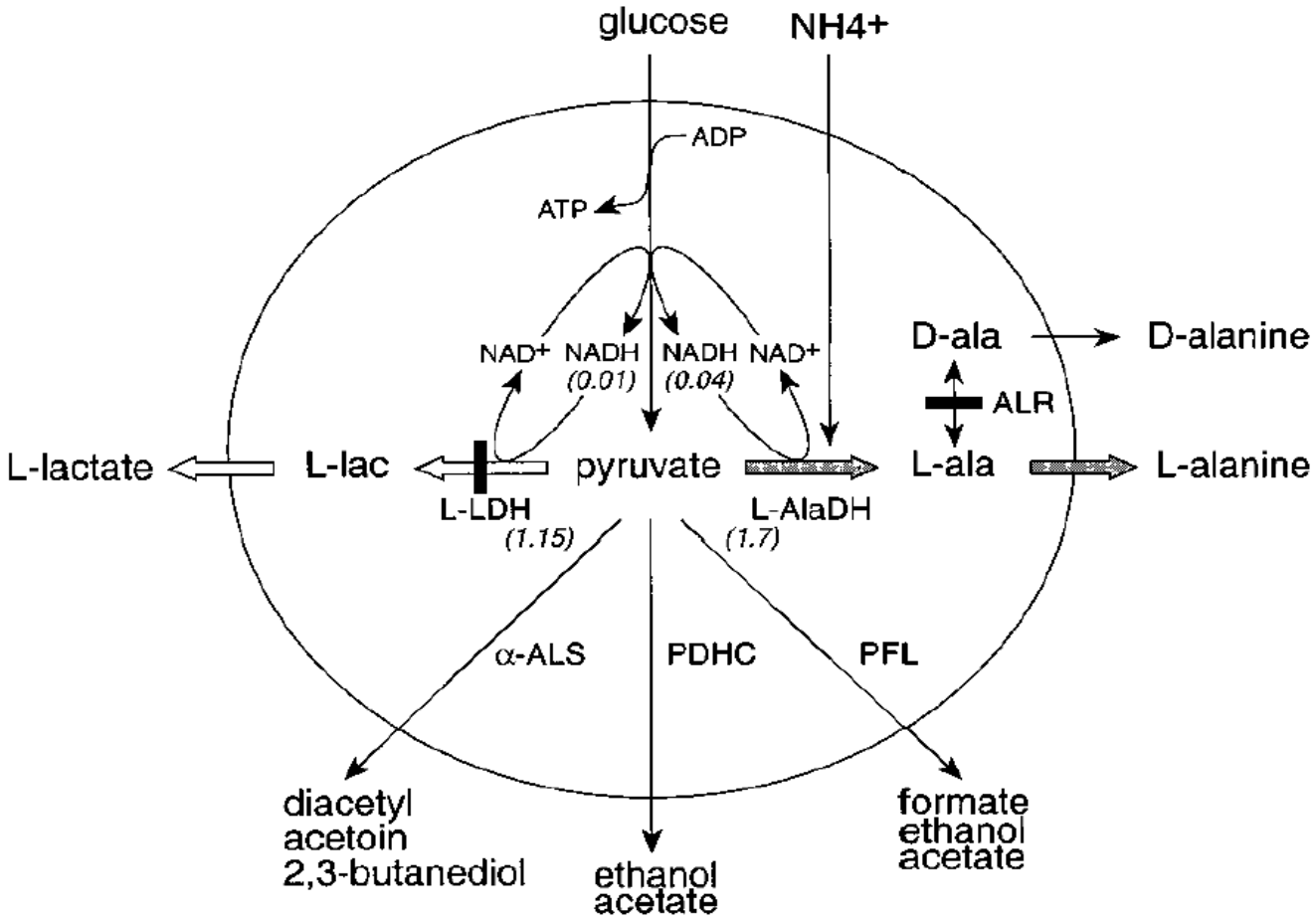
Proteina	Utilizzo
Insulina umana	Trattamento del diabete
Ormone della crescita umano	Trattamento di determinati disordini endocrini
Eritropoietina	Stimolazione della produzione di globuli rossi
Fattori di stimolazione delle colonie	Produzione e attivazione di globuli bianchi
Fattori di coagulazione IX e X	Trattamento dei disordini a carico della coagulazione del sangue (emofilia)
Attivatore tissutale del plasminogeno	Lisi dei coaguli di sangue in casi di attacco cardiaco e di ictus
Ormone della crescita bovino	Produzione di latte nelle mucche
Antigene di superficie dell'epatite B	Vaccinazione contro l'epatite B

Il mais e il teosinto differiscono per pochi geni

Ingegneria Metabolica

Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering

NATURE BIOTECHNOLOGY VOL 17 JUNE 1999



La manipolazione del DNA

Punto di verifica

- Definite che cos'è una molecola di DNA ricombinante.
- Illustrate le possibilità tecnologiche che si aprono con con la tecnologia del DNA ricombinante.
- Definite che cos'è un organismo geneticamente modificato (OGM).