

INDICE GENERALE

Risorse digitali	XI
Prefazione	XIII

Parte I

I principi fondamentali del clonaggio dei geni e dell'analisi del DNA

Capitolo 1

L'importanza del clonaggio dei geni e dell'analisi del DNA	3
1.1 I primi sviluppi della genetica	3
1.2 L'introduzione del clonaggio e della reazione a catena della polimerasi (PCR)	4
1.3 Che cosa si intende per clonaggio di un gene?	4
1.4 Che cos'è la PCR?	6
1.5 Perché il clonaggio genico e la PCR sono importanti	7
1.5.1 Ottenere una preparazione pura di un gene attraverso il clonaggio	7
1.5.2 Anche la PCR può essere usata per isolare un gene	9
1.6 Come orientarsi in questo libro	11
<i>Bibliografia</i>	12

Capitolo 2

I vettori per il clonaggio dei geni: plasmidi e batteriofagi	13
2.1 I plasmidi	13
2.1.1 Dimensione e numero di copie	15
2.1.2 Coniugazione e compatibilità	16
2.1.3 Classificazione dei plasmidi	16
2.1.4 Plasmidi in organismi diversi dai batteri	17
2.2 I batteriofagi	17
2.2.1 Ciclo infettivo dei fagi	18
2.2.2 Fagi lisogeni	19
I geni sul DNA del fago λ sono organizzati in gruppi	20
Il DNA del fago λ può essere lineare o circolare	21
M13, un fago filamentoso	22
2.2.3 Virus come vettori di clonaggio per altri organismi	24
<i>Bibliografia</i>	24

Capitolo 3

La purificazione del DNA dalle cellule	25
3.1 Come isolare il DNA cellulare totale	25
3.1.1 Crescita e raccolta di una coltura di cellule batteriche	26
3.1.2 Preparazione di un estratto cellulare	28
3.1.3 Purificazione del DNA da un estratto cellulare	29
Rimozione dei contaminanti tramite estrazione con solventi organici e digestione enzimatica	29
Utilizzo della cromatografia a scambio ionico per la purificazione del DNA da estratti cellulari	30
Utilizzo del silice per purificare il DNA da estratti cellulari	30
3.1.4 Concentrare il DNA	33
3.1.5 Misurare la concentrazione di DNA	33
3.1.6 Altri metodi per isolare il DNA cellulare totale	34
3.2 Come isolare il DNA plasmidico	36
3.2.1 Separazione sulla base delle dimensioni	36
3.2.2 Separazione in base alla conformazione	37
Denaturazione alcalina	38
Centrifugazione in gradiente di densità con bromuro d'etidio e cesio cloruro	38
3.2.3 Amplificazione dei plasmidi	40
3.3 Come isolare il DNA fagico	41
3.3.1 Allestimento di colture per ottenere titoli elevati di fago λ	41
3.3.2 Preparazione di fagi λ non lisogeni	42
3.3.3 Raccolta dei fagi da una coltura di cellule infette	43
3.3.4 Purificazione del DNA dalle particelle di fago λ	44
3.3.5 La purificazione del DNA di M13 è meno problematica	44
<i>Bibliografia</i>	45

Capitolo 4

La manipolazione del DNA purificato	46
4.1 Gli enzimi per la manipolazione del DNA	47
4.1.1 Nucleasi	47
4.1.2 Ligasi	49
4.1.3 Polimerasi	49
4.1.4 Enzimi che modificano il DNA	51
4.2 Gli enzimi che tagliano il DNA: le endonucleasi di restrizione	51
4.2.1 Scoperta e funzione delle endonucleasi di restrizione	52
4.2.2 Le endonucleasi di restrizione di tipo II tagliano il DNA in corrispondenza di sequenze nucleotidiche specifiche	53

4.2.3	Estremità piatte ed estremità coesive	54
4.2.4	Determinazione della frequenza delle sequenze bersaglio in una molecola di DNA	55
4.2.5	Eseguire una digestione con enzimi di restrizione in laboratorio	56
4.2.6	Analisi dei risultati della reazione di taglio da parte di un'endonucleasi di restrizione	58
	Separazione delle molecole tramite elettroforesi su gel	58
	Visualizzazione delle molecole di DNA all'interno del gel di agarosio	58
4.2.7	Determinazione delle dimensioni delle molecole di DNA	60
4.2.8	Mappatura della posizione dei siti di restrizione lungo la molecola di DNA	60
4.2.9	Tecniche specializzate di elettroforesi su gel per la separazione di grandi molecole di DNA	63
4.3	La ligazione: unire insieme frammenti di DNA	65
4.3.1	Meccanismo d'azione della DNA ligasi	65
4.3.2	Le estremità coesive aumentano l'efficienza della ligazione	65
4.3.3	Come dotare di estremità coesive una molecola di DNA con estremità piatte	66
	Linker	66
	Adattatori	67
	Generare estremità coesive mediante code omopolimeriche	70
4.3.4	Ligazione di estremità piatte con la DNA topoisomerasi	71
Bibliografia		73

Capitolo 5

	L'introduzione di DNA nelle cellule viventi	74
5.1	La trasformazione: la captazione del DNA da parte delle cellule batteriche	76
5.1.1	Le specie batteriche hanno efficienze differenti nell'incorporare DNA esogeno	76
5.1.2	Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	76
5.1.3	Selezione delle cellule trasformate	77
5.2	L'identificazione dei ricombinanti	79
5.2.1	Selezione dei ricombinanti per pBR322 mediante inattivazione inserzionale di un gene di resistenza agli antibiotici	79
5.2.2	L'inattivazione inserzionale non sempre riguarda la resistenza a un antibiotico	81
5.3	L'introduzione di DNA fagico nelle cellule batteriche	83
5.3.1	Trasfezione	83
5.3.2	Impacchettamento <i>in vitro</i> di vettori di clonaggio basati sul fago λ	83
5.3.3	L'infezione da parte dei fagi causa la formazione di placche in terreno agar	83
5.3.4	Identificazione dei fagi ricombinanti	85
	Inattivazione inserzionale del gene <i>lacZ'</i> portato da un vettore fagico	85

	Inattivazione inserzionale del gene <i>ci</i> di λ	85
	Selezione tramite fenotipo Spi	86
	Selezione sulla base delle dimensioni del genoma di λ	87
5.4	L'introduzione di DNA nelle cellule non batteriche	87
5.4.1	Trasformazione di singole cellule	87
5.4.2	Trasformazione di interi organismi	89
Bibliografia		89

Capitolo 6

	I vettori di clonaggio per <i>Escherichia coli</i>	90
6.1	I vettori derivati da plasmidi di <i>E. coli</i>	90
6.1.1	Nomenclatura dei vettori di clonaggio plasmidici	91
6.1.2	Proprietà utili di pBR322	91
6.1.3	Pedigree di pBR322	92
6.1.4	Vettori plasmidici avanzati per <i>E. coli</i>	92
	pUC8: vettore con selezione per il fenotipo Lac	93
	pGEM3Z: vettore per la trascrizione <i>in vitro</i> del DNA clonato	95
6.2	I vettori derivati dal fago λ	96
6.2.1	Isolamento tramite selezione naturale di fagi λ modificati, privi di specifici siti di restrizione	96
6.2.2	Si possono rimuovere segmenti del genoma di λ senza compromettere la funzionalità del fago	97
6.2.3	Vettori di inserzione e di sostituzione	98
	Vettori di inserzione	98
	Vettori di sostituzione	99
6.2.4	Clonaggio con vettori λ di inserzione e di sostituzione	100
6.2.5	Lunghi frammenti di DNA possono essere clonati nei cosmidi	101
6.2.6	Vettori λ e altri vettori a elevata capacità permettono la costruzione di librerie genomiche	102
6.3	I vettori per la produzione di DNA a singola elica	103
6.3.1	Vettori basati sul batteriofago M13	103
6.3.2	Vettori ibridi plasmide-M13	104
6.4	I vettori per altri batteri	106
Bibliografia		107

Capitolo 7

	I vettori di clonaggio per le cellule eucariote	108
7.1	I vettori per lieviti e altri funghi	108
7.1.1	Marcatori di selezione per il plasmide 2 μ m	109
7.1.2	Vettori derivati dal plasmide 2 μ m: i plasmidi episomici di lievito	110
7.1.3	Il plasmide YEp può integrarsi nel DNA cromosomico di lievito	110

7.1.4	Altri tipi di vettori per il clonaggio in lievito	110
7.1.5	I cromosomi artificiali possono essere utilizzati per clonare lunghi frammenti di DNA in lievito	113
	Struttura e utilizzo di un vettore YAC	114
	Applicazioni dei vettori YAC	115
7.1.6	Vettori per altri lieviti e funghi	115
7.2	I vettori per le piante superiori	116
7.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , il più piccolo ingegnere genetico naturale	116
	Utilizzo del plasmide Ti per introdurre geni esogeni in una cellula vegetale	117
	Produzione di piante trasformate con il plasmide Ti	119
	Limitazioni del clonaggio con i plasmidi di <i>Agrobacterium</i>	120
7.2.2	Clonaggio di geni in piante per trasferimento genico diretto	121
	Trasferimento genico diretto nel nucleo	121
	Inserimento di geni nel genoma dei cloroplasti	123
7.2.3	Tentativi di utilizzare i virus delle piante come vettori di clonaggio	123
	Vettori basati sui caulimovirus	123
	Vettori basati sui geminivirus	124
7.3	I vettori per gli animali	125
7.3.1	Vettori di clonaggio per gli insetti	125
	Elementi P come vettori di clonaggio per <i>Drosophila</i>	125
	Vettori di clonaggio basati su virus degli insetti	126
7.3.2	Clonaggio nei mammiferi	127
	Virus come vettori di clonaggio per le cellule di mammifero	127
	Clonaggio di geni senza l'utilizzo di vettori	128
	<i>Bibliografia</i>	129

Capitolo 8

	L'isolamento del clone di un singolo gene	131
8.1	Il problema della selezione	131
8.1.1	Sono due le tecniche fondamentali per ottenere il clone di interesse	131
8.2	La selezione diretta	133
8.2.1	Recupero della capacità di sopravvivenza indotto dal marcatore e le applicazioni della selezione diretta	133
8.2.2	Scopi e limiti della tecnica del recupero della sopravvivenza	135
8.3	L'identificazione di un clone all'interno di una genoteca	136
8.3.1	Librerie di geni	136
	Non tutti i geni vengono espressi contemporaneamente	137
	Gli mRNA possono essere clonati sotto forma di DNA complementare	137
8.4	I metodi per identificare un clone	139
8.4.1	I filamenti complementari di acido nucleico danno ibridazione reciproca	139
8.4.2	Analisi con sonda di ibridazione su colonie o placche	140
	Marcatore con tracciante radioattivo	141
	Marcatore non radioattivo	142

8.4.3	Esempi pratici di utilizzo delle sonde di ibridazione	142
	Sonde a elevata frequenza di ibridazione per analizzare una libreria di cDNA	143
	Sonde oligonucleotidiche per geni i cui prodotti proteici sono stati caratterizzati	144
	Le sonde eterologhe permettono l'identificazione di geni simili	147
	L'ibridazione con il metodo di Southern consente di identificare un frammento di restrizione specifico contenente il gene desiderato	147
8.4.4	Metodi di identificazione basati sul rilevamento della presenza del prodotto di traduzione del gene clonato	148
	I metodi di rilevazione immunologica richiedono la presenza di anticorpi	149
	Utilizzo di anticorpi purificati per la rilevazione di una proteina in colonie ricombinanti	149
	Problema dell'espressione genica	150
	<i>Bibliografia</i>	151

Capitolo 9

	La reazione a catena della polimerasi (PCR)	153
9.1	La PCR in breve	153
9.2	La PCR in maggiore dettaglio	156
9.2.1	Progettazione dei primer oligonucleotidici per un esperimento di PCR	156
9.2.2	Determinazione della temperatura corretta da utilizzare	158
9.3	Dopo la PCR: la caratterizzazione dei prodotti di amplificazione	160
9.3.1	Elettroforesi su gel dei prodotti di PCR	160
9.3.2	Clonaggio dei prodotti di PCR	162
9.4	La real time PCR	164
9.4.1	Come si effettua un esperimento di PCR quantitativa	164
9.4.2	Grazie alla real time PCR è possibile quantificare il materiale di partenza	165
9.4.3	Analisi delle curve di denaturazione per identificare la presenza di mutazioni puntiformi	167
	<i>Bibliografia</i>	168

Parte II Il clonaggio dei geni e l'analisi del DNA nella ricerca scientifica

Capitolo 10

	Il sequenziamento dei geni e dei genomi	171
10.1	Il sequenziamento tramite terminazione della catena di DNA	172
10.1.1	Visione d'insieme del sequenziamento a terminazione di catena	172

10.1.2	Non tutte le DNA polimerasi possono essere utilizzate per il sequenziamento	174
10.1.3	Sequenziamento a terminazione di catena con la DNA polimerasi <i>Taq</i>	175
10.1.4	Limiti del sequenziamento a terminazione di catena	177
10.2	Le tecniche di sequenziamento di nuova generazione	178
10.2.1	Come allestire una libreria per il sequenziamento con il metodo Illumina	179
	Frammentazione del DNA	179
	Immobilizzazione della libreria	180
	Amplificazione della libreria	180
10.2.2	Fase di sequenziamento con il metodo Illumina	181
10.2.3	Sequenziamento a semiconduttori ionici	182
10.2.4	Metodi di sequenziamento di ultima generazione	183
10.2.5	Sequenziamento di nuova generazione senza l'utilizzo di una DNA polimerasi	184
10.2.6	Sequenziamento di geni specifici con le tecniche di nuova generazione	185
10.3	Come si sequenzia un genoma	186
10.3.1	Approccio <i>shotgun</i> per il sequenziamento dei genomi dei procarioti	187
	Sequenziamento <i>shotgun</i> del genoma di <i>Haemophilus influenzae</i>	187
	Sequenziamento <i>shotgun</i> del genoma di altri procarioti	190
10.3.2	Sequenziamento dei genomi degli eucarioti	191
	Sequenziamento tramite <i>shotgun</i> gerarchico	191
	Sequenziamento <i>shotgun</i> di genomi degli eucarioti	194
	Che cosa si intende per "sequenza genomica"?	195
<i>Bibliografia</i>		196

Capitolo 11

Lo studio dell'espressione e della funzione dei geni		198
11.1	Studiare il trascritto di RNA di un gene	199
11.1.1	Come individuare la presenza di uno specifico trascritto all'interno di una miscela di RNA	199
11.1.2	Mappare i trascritti tramite l'ibridazione di un gene al suo RNA	201
11.1.3	Analisi dei trascritti tramite allungamento di primer	203
11.1.4	Analisi dei trascritti tramite PCR	204
11.2	Studiare la regolazione dell'espressione genica	205
11.2.1	Identificare i siti di legame per proteine su una molecola di DNA	206
	Rallentamento su gel di complessi DNA-proteine	206
	<i>Footprinting</i> con DNasi I	207
	Saggio di interferenza per modificazione	208
11.2.2	Identificare le sequenze di regolazione tramite analisi di delezione	209
	Geni reporter	210
	Come si esegue un'analisi di delezione	212

11.3	Identificare e studiare il prodotto della traduzione di un gene clonato	213
11.3.1	Le tecniche HRT e HART consentono di identificare il prodotto di traduzione di un gene	213
11.3.2	Analisi delle proteine per mutagenesi <i>in vitro</i>	215
	Esistono tipi diversi di mutagenesi <i>in vitro</i>	216
	Introdurre una mutazione puntiforme in un gene clonato usando un oligonucleotide	216
	Altri metodi per generare una mutazione puntiforme in un gene clonato	218
	Poteniali applicazioni della mutagenesi <i>in vitro</i>	219
<i>Bibliografia</i>		221

Capitolo 12

Lo studio dei genomi		222
12.1	L'identificazione dei geni in una sequenza genomica	223
12.1.1	Identificazione dei geni che codificano le proteine tramite scansione della sequenza genomica	223
	Ricerca delle fasi di lettura aperte	223
	Le scansioni delle ORF sono poco efficaci nel localizzare i geni all'interno dei genomi degli eucarioti	224
12.1.2	Localizzazione dei geni con il supporto della ricerca di omologia	225
12.1.3	Localizzazione di geni esprimenti trascritti di RNA non codificanti	227
12.1.4	Identificazione dei siti di legame per proteine regolatrici in una sequenza genomica	228
12.2	La determinazione della funzione di un gene	229
12.2.1	Attribuzione della funzione a geni tramite approcci sperimentali	229
	Geni specifici possono essere inattivati per ricombinazione omologa	231
	Inattivazione di geni tramite nucleasi programmabili	232
12.3	Gli strumenti di navigazione delle banche dati genomiche	234
<i>Bibliografia</i>		235

Capitolo 13

Studiare i trascrittomi e i proteomi		236
13.1	Studiare i trascrittomi	236
13.1.1	Studiare i trascrittomi attraverso microarray e chip di DNA	236
13.1.2	Studiare i trascrittomi tramite il sequenziamento dell'RNA	238
	Sequenziare il trascrittoma con la metodica RNA-seq	238
	Studiare il trascrittoma mediante la tecnica SAGE	240
	La tecnica CAGE si basa su principi simili a SAGE, ma è più adatta alle applicazioni di RNA-seq	241

13.2 Studiare i proteomi	243
13.2.1 Come si determina il profilo proteico	243
Separazione delle proteine di un proteoma tramite elettroforesi su gel di poliaccrilammide	243
Separazione delle proteine tramite cromatografia su colonna	244
Come identificare le singole proteine dopo la separazione	245
Paragonare i profili proteici di proteomi differenti	246
13.2.2 Studiare le interazioni tra proteine	247
<i>Phage display</i>	247
Il sistema del doppio ibrido in lievito	249
Array proteici funzionali	249
<i>Bibliografia</i>	251

Parte III

Le applicazioni biotecnologiche del clonaggio e dell'analisi del DNA

Capitolo 14

La produzione di proteine da geni clonati	255
14.1 I vettori specifici per l'espressione di geni eterologhi in <i>E. coli</i>	257
14.1.1 Il promotore è un componente essenziale dei vettori di espressione	259
Il promotore deve essere selezionato con cura	259
Alcuni promotori comunemente utilizzati nei vettori di espressione	261
14.1.2 Cassette e geni di fusione	262
14.2 I problemi comuni nella produzione di proteine ricombinanti in <i>E. coli</i>	265
14.2.1 Problemi dovuti alla sequenza del gene esogeno	265
14.2.2 Problemi dovuti all'utilizzo di <i>E. coli</i> come ospite	267
14.3 La produzione di proteine ricombinanti nelle cellule eucariote	268
14.3.1 Espressione di proteine ricombinanti in lieviti e funghi filamentosi	268
Lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> come ospite per l'espressione di proteine ricombinanti	268
Altri lieviti e funghi	269
14.3.2 Utilizzo di cellule animali per la produzione di proteine ricombinanti	270
Produzione di proteine in cellule di mammifero	270
Produzione di proteine in cellule di insetto	271
14.3.3 <i>Pharming</i>: produzione di proteine ricombinanti da animali e piante	272
<i>Pharming</i> e animali	272
Produzione di proteine ricombinanti in piante	273
Considerazioni etiche relative al <i>pharming</i>	274
<i>Bibliografia</i>	275

Capitolo 15

Il clonaggio e l'analisi del DNA in medicina	277
15.1 La produzione di principi farmaceutici con la tecnologia del DNA ricombinante	277
15.1.1 Produzione di insulina ricombinante	277
Sintesi ed espressione di geni artificiali per l'insulina	279
15.1.2 Sintesi di ormoni della crescita umani in <i>E. coli</i>	279
15.1.3 Produzione di fattore VIII ricombinante	282
15.1.4 Sintesi di altre proteine ricombinanti umane	283
15.1.5 Vaccini ricombinanti	283
Produzione di vaccini con proteine ricombinanti	284
Vaccini ricombinanti da piante transgeniche	286
Vaccini vivi ricombinanti	288
15.2 L'identificazione di geni responsabili di patologie umane	289
15.2.1 Come identificare il gene responsabile di una malattia genetica	290
Localizzare la posizione approssimativa del gene all'interno del genoma umano	291
Analisi di associazione per il gene umano <i>BRCA1</i>	292
Identificazione dei candidati per il gene-malattia	294
15.2.2 Genotipizzazione di mutazioni malattia	295
15.3 La terapia genica	297
15.3.1 Terapia genica per le malattie ereditarie	297
15.3.2 Terapia genica e cancro	298
15.3.3 Aspetti etici della terapia genica	300
<i>Bibliografia</i>	301

Capitolo 16

Il clonaggio e l'analisi del DNA in agricoltura	303
16.1 Il trasferimento genico per la manipolazione genetica delle piante	304
16.1.1 Piante che producono i propri pesticidi	304
δ -Endotossine di <i>Bacillus thuringiensis</i>	304
Clonaggio del gene della δ -endotossina nel mais	305
Clonaggio del gene della δ -endotossina nei cloroplasti	307
Problema della resistenza degli insetti alle coltivazioni esprimenti δ -endotossine	308
16.1.2 Coltivazioni resistenti agli erbicidi	310
Coltivazioni "Roundup Ready"	310
Coltivazioni resistenti al glifosato di nuova generazione	311
16.1.3 Come aumentare il valore nutrizionale delle piante attraverso trasferimento genico	312
16.1.4 Altri programmi di trasferimento genico	313
16.2 La sottrazione genica	315
16.2.1 Tecnologia degli RNA antisense per modificare la maturazione dei pomodori	315
Utilizzo degli RNA antisense per l'inattivazione del gene della poligalatturonasi	315

	Utilizzo degli RNA antisenso per l'inattivazione della sintesi di etilene	317
16.2.2	Altri esempi di utilizzo degli RNA antisenso nell'ingegneria genetica vegetale	318
16.3	L'editing genomico tramite nucleasi programmabili	319
16.3.1	Editing genomico della fitoene desaturasi del riso	319
16.3.2	Editing di più geni in una singola pianta	321
16.3.3	Sviluppi futuri dell'editing genomico in campo agricolo	322
16.4	Le piante GM sono pericolose per la salute umana e per l'ambiente?	324
16.4.1	Preoccupazioni riguardo alla sicurezza dell'uso dei marcatori di selezione	324
16.4.2	Possibili effetti dannosi sull'ambiente	325
	<i>Bibliografia</i>	326

Capitolo 17

	Il clonaggio e l'analisi del DNA nelle scienze forensi e in archeologia	328
17.1	L'analisi del DNA per identificare chi ha commesso un crimine	328
17.1.1	Determinazione dell'impronta genetica tramite ibridazione con sonda	329
17.1.2	Ottenimento del profilo di DNA con l'analisi tramite PCR delle corte ripetizioni in tandem	330
17.2	Lo studio delle parentele attraverso l'analisi dei profili di DNA	332
17.2.1	Individui imparentati hanno profili di DNA simili	332

17.2.2	Analisi del profilo di DNA effettuata sulle spoglie della famiglia Romanov	332
	Analisi delle STR partendo dalle ossa dei Romanov	332
	L'analisi del DNA mitocondriale è stata usata per collegare i resti dei Romanov alla loro discendenza vivente	334
	Il caso dei figli mancanti	335
17.3	La determinazione del sesso tramite l'analisi del DNA	335
17.3.1	Analisi di PCR per sequenze specifiche del cromosoma Y	335
17.3.2	PCR per il gene dell'amelogenina	336
17.4	L'archeogenetica: utilizzare il DNA per studiare la preistoria dell'umanità	337
17.4.1	Origine dell'essere umano moderno	338
	L'analisi del DNA ha messo in discussione l'ipotesi multiregionale	338
	L'analisi del DNA ha mostrato che i Neanderthal non sono gli antenati diretti delle popolazioni europee moderne	339
	La sequenza del genoma dei Neanderthal suggerisce un incrocio genetico con <i>H. sapiens</i>	340
17.4.2	Il DNA può essere utilizzato anche per studiare le migrazioni della specie umana	342
	L'essere umano moderno potrebbe essere migrato dall'Etiopia alla penisola arabica	342
	Colonizzazione del Nuovo Mondo	344
	<i>Bibliografia</i>	346

	Glossario	349
--	------------------	-----

	Indice analitico	362
--	-------------------------	-----