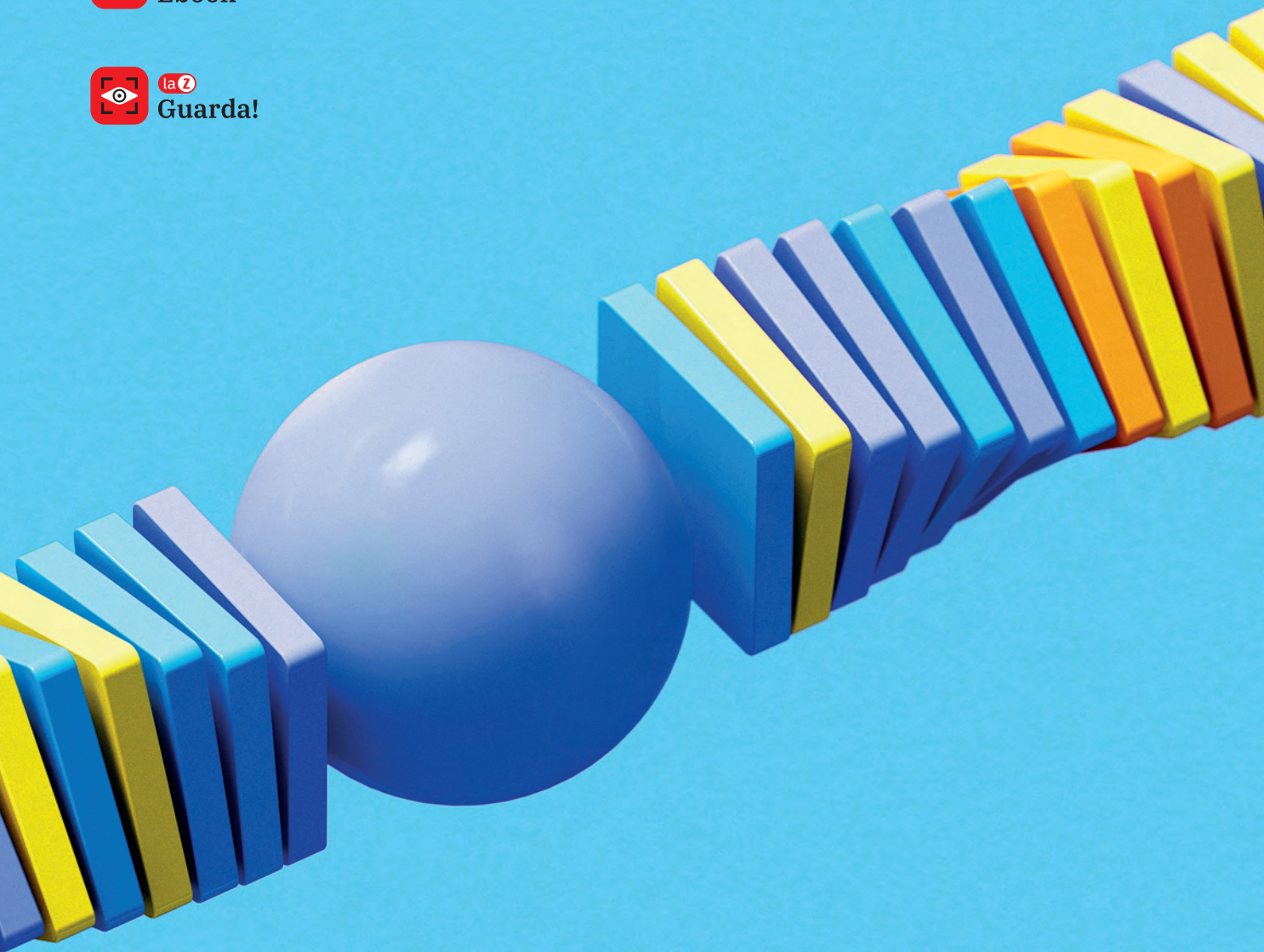


Desmond S.T. Nicholl

Ingegneria genetica

A cura di Paolo Laveder e Cristiano De Pittà



GENETICA **ZANICHELLI**

Desmond S.T. Nicholl

Ingegneria genetica

A cura di Paolo Laveder e Cristiano De Pittà

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

1. Vai su **my.zanichelli.it**
2. Clicca su *Registrati*.
3. Scegli *Studente*.
4. Segui i passaggi richiesti per la registrazione.
5. Riceverai un'email: clicca sul link per completare la registrazione.
6. Cerca il tuo codice di attivazione stampato sull'etichetta in questa pagina.
7. Inseriscilo nella tua area personale su **my.zanichelli.it**

Se hai già effettuato la registrazione, per accedere ai contenuti riservati ti serve solo il codice di attivazione.



la **Z** Guarda!

Il digitale del tuo libro,
sul tuo device

SCARICA LA APP



DA:



1 Sul libro, inquadra l'icona



2 Sullo schermo,
tocca le icone

3 Guarda i video e gli altri contenuti digitali

GENETICA ZANICHELLI

Indice generale

Risorse digitali XI

Prefazione XIII

Parte 1 L'ingegneria genetica nel contesto 1

1 Introduzione 3

1.1 Che cos'è l'ingegneria genetica? 3

1.2 Le basi della genetica molecolare 5

1.3 I primi passi nel clonaggio del DNA 6

1.4 L'utilizzo della Rete come supporto allo studio 8

1.5 Conclusioni: ampiezza e portata dell'ingegneria genetica 12

Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire 13

Mappe concettuali 1 Ingegneria genetica 15

2 La storia del DNA 16

2.1 Come funziona la scienza 16

2.1.1 Un modello semplice per il metodo scientifico 21

2.1.2 Un modello più realistico di come funziona la scienza 22

2.2 Il DNA: una linea del tempo biografica 24

2.3 Persone, luoghi e progresso: cambiamenti di paradigma o di passo? 24

2.4 Conclusioni: il panorama scientifico 25

Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire 31

Mappe concettuali 2 Storia del DNA 33

3 Mondo nuovo o incubo genetico? 34

3.1 Che cos'è l'etica? 34

3.1.1 Il quadro etico 35

3.1.2	La scienza è eticamente e moralmente neutrale?	36
3.1.3	L'ambito della bioetica	37
3.2	Gli elementi del dibattito etico	38
3.2.1	Il ruolo dello scienziato	39
3.2.2	Il ruolo della società	39
3.2.3	I problemi attuali nella bioetica	40
3.3	Conclusioni: il mostro di Frankenstein è uscito dal vaso di Pandora?	42
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	43

Mappa concettuale 3 Etica e ingegneria genetica

45

Parte 2 Le basi dell'ingegneria genetica

47

4	Introduzione alla biologia molecolare	49
4.1	Come sono organizzati i sistemi viventi	49
4.2	Il flusso delle informazioni genetiche	51
4.3	La struttura del DNA e dell'RNA	53
4.4	L'organizzazione dei geni	55
4.4.1	L'anatomia di un gene	56
4.4.2	La struttura dei geni nei procarioti	57
4.4.3	La struttura dei geni negli eucarioti	58
4.5	L'espressione genica	58
4.5.1	Dai geni alle proteine	59
4.5.2	Trascrizione e traduzione	60
4.5.3	La regolazione dell'espressione genica	61
4.6	Geni e genomi	63
4.6.1	Dimensione e complessità del genoma	63
4.6.2	L'organizzazione del genoma	65
4.6.3	Trascrittoma e proteoma	65
4.7	Conclusioni: struttura e funzione	66
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	67

Mappa concettuale 4 Materiale genetico

69

5	Gli strumenti del mestiere	70
5.1	Gli enzimi di restrizione: il taglio del DNA	70
5.1.1	Le endonucleasi di restrizione di tipo II	71
5.1.2	L'uso delle endonucleasi di restrizione	72
5.1.3	La mappatura dei siti di restrizione	74
5.2	Gli enzimi di modifica del DNA	75
5.2.1	Le nucleasi	76
5.2.2	Le polimerasi	77
5.2.3	Gli enzimi che modificano le estremità delle molecole di DNA	78
5.3	La DNA ligasi: l'unione delle molecole di DNA	78

5.4 Conclusioni: il kit di strumenti dell'ingegneria genetica	79
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	80

Mappa concettuale 5	Tagliare, unire e modificare il DNA	82
----------------------------	--	-----------

6 Lavorare con gli acidi nucleici	83
6.1 L'evoluzione del laboratorio	83
6.2 L'isolamento di DNA ed RNA	86
6.3 Manipolazione e quantificazione degli acidi nucleici	88
6.4 La marcatura degli acidi nucleici	89
6.4.1 I tipi di marcatore: radioattivo o no?	89
6.4.2 La marcatura delle estremità	90
6.4.3 Nick translation	91
6.4.4 La marcatura mediante primer extension	92
6.5 L'ibridazione degli acidi nucleici	92
6.6 L'elettroforesi su gel	94
6.7 Il sequenziamento del DNA: la prima generazione	96
6.7.1 I principi del sequenziamento del DNA di prima generazione	98
6.7.2 Il sequenziamento di Sanger (metodo dei dideoxi o enzimatico)	98
6.7.3 Elettroforesi e lettura delle sequenze	99
6.7.4 Automazione e sequenziamento del DNA su larga scala	100
6.8 Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione	101
6.8.1 NGS: un cambiamento di passo nel sequenziamento del DNA	101
6.8.2 I principi dei metodi NGS	102
6.8.3 I metodi NGS	104
6.9 Conclusioni: tecniche e metodi essenziali	110
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	111

Mappa concettuale 6	Lavorare con gli acidi nucleici	113
----------------------------	--	------------

Parte 3 I metodi di manipolazione genica	115
---	------------

7 Cellule ospiti e vettori	117
7.1 I tipi di cellule ospiti	118
7.1.1 Gli ospiti procarioti	118
7.1.2 Gli ospiti eucarioti	119
7.2 I vettori plasmidici utilizzati in <i>E. coli</i>	119
7.2.1 Che cosa sono i plasmidi?	120
7.2.2 I plasmidi di clonaggio di base	120
7.2.3 I vettori plasmidici più particolari	121
7.3 I vettori batteriofagici utilizzati in <i>E. coli</i>	123
7.3.1 Che cosa sono i batteriofagi?	123
7.3.2 I vettori basati sul batteriofago λ	126
7.3.3 I vettori basati sul batteriofago M13	128
7.4 Altri vettori	128
7.4.1 I vettori ibridi plasmidici/fagici	129

7.4.2	I vettori utilizzati nelle cellule eucariote	130
7.4.3	I cromosomi artificiali	131
7.5	L'introduzione del DNA nelle cellule	132
7.5.1	Trasformazione e transfezione	133
7.5.2	Il packaging <i>in vitro</i> del DNA fagico	133
7.5.3	I metodi alternativi per introdurre il DNA	134
7.6	Conclusioni: da <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	135
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	137

Mappa concettuale 7 Cellule ospiti e vettori **139**

8	Le strategie di clonaggio	140
8.1	Qual è l'approccio migliore?	140
8.1.1	Il clonaggio nell'era pre-genomica	141
8.1.2	Il clonaggio (o no) nelle ere genomica e post-genomica	142
8.2	La generazione di frammenti di DNA per il clonaggio	143
8.2.1	Il DNA genomico	143
8.2.2	La sintesi di cDNA	145
8.2.3	I frammenti di PCR	146
8.2.4	La biologia sintetica: creare geni da zero	147
8.3	L'inserimento di frammenti di DNA nei vettori	147
8.3.1	La ligazione di frammenti con estremità piatte/coesive	147
8.3.2	L'aggiunta di code omopolimeriche	148
8.3.3	Linker e adattatori	149
8.3.4	Altri metodi per unire frammenti e vettori di DNA	150
8.4	Mettere tutto insieme	152
8.4.1	Il clonaggio in un vettore λ di sostituzione	153
8.4.2	L'espressione di molecole di cDNA clonate	154
8.4.3	Il clonaggio di grandi frammenti di DNA nei vettori BAC e YAC	155
8.4.4	La tecnologia di clonaggio Gateway	156
8.4.5	Clonaggio e assemblaggio Golden Gate	157
8.4.6	Il metodo di assemblaggio Gibson	158
8.5	Conclusioni: l'elaborazione di una strategia di clonaggio	159
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	160

Mappa concettuale 8 Strategie di clonaggio **162**

9	La reazione a catena della polimerasi	163
9.1	La storia della PCR	163
9.2	La tecnica della PCR	164
9.2.1	Le caratteristiche essenziali della PCR	164
9.2.2	La progettazione dei primer per la PCR	166
9.2.3	Le DNA polimerasi per la PCR	167
9.3	Le tecniche di PCR più particolari	168
9.3.1	La PCR che utilizza stampi di mRNA	169
9.3.2	La PCR annidata	170
9.3.3	La PCR inversa	171

9.3.4	PCR quantitativa e PCR digitale	172
9.3.5	RAPD e diversi altri acronimi	174
9.4	Elaborazione e analisi dei prodotti della PCR	175
9.5	Conclusioni: l'impatto rivoluzionario della PCR	175
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	177

Mapa concettuale 9	Reazione a catena della polimerasi	179
---------------------------	---	------------

10	Selezione, screening e analisi dei ricombinanti	180
10.1	I metodi di selezione e screening genetici	181
10.1.1	L'uso di substrati cromogeni	181
10.1.2	L'inattivazione inserzionale	182
10.1.3	La complementazione di mutazioni definite	184
10.1.4	Altri metodi di selezione genetica	184
10.2	Lo screening mediante ibridazione degli acidi nucleici	185
10.2.1	Le sonde di acido nucleico	185
10.2.2	Lo screening di librerie di cloni	186
10.3	L'uso della PCR nei protocolli di screening	188
10.4	Lo screening immunologico per i geni espressi	188
10.5	L'analisi dei geni clonati	190
10.5.1	La mappatura dei siti di restrizione	190
10.5.2	Le tecniche di blotting	190
10.5.3	Il subclonaggio	192
10.5.4	Il sequenziamento del DNA	193
10.6	Conclusioni: aghi nei pagliai	193
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	194

Mapa concettuale 10	Selezione, screening e analisi dei ricombinanti	196
----------------------------	--	------------

11	La bioinformatica	197
11.1	Che cos'è la bioinformatica?	198
11.1.1	La tecnologia dell'informazione	198
11.1.2	L'impatto di Internet e del World Wide Web	199
11.2	I set di dati biologici	200
11.2.1	Generazione e organizzazione delle informazioni	200
11.2.2	Le banche dati primarie e secondarie	201
11.2.3	Le banche dati di acidi nucleici	202
11.2.4	Le banche dati di proteine	202
11.2.5	Altre risorse bioinformatiche	204
11.3	La bioinformatica come strumento	206
11.3.1	Evitare l'effetto "GIGO": gli esperimenti reali	206
11.3.2	Evitare la provetta: la sperimentazione computazionale	207
11.3.3	La presentazione delle informazioni delle banche dati	208
11.4	Conclusioni: bioscienze e "big data"	209
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	210

Mapa concettuale 11	Bioinformatica	212
----------------------------	-----------------------	------------

12 L'editing genomico	213
12.1 Il targeting genico	214
12.2 L'editing genomico mediante nucleasi	215
12.2.1 Le nucleasi a dito di zinco	215
12.2.2 Le nucleasi TALEN	216
12.2.3 Il sistema CRISPR-Cas9	217
12.2.4 Il prime editing	219
12.3 Il potenziale dell'editing dell'RNA	219
12.4 Dove può portarci l'editing genomico?	221
12.5 Conclusioni: dalla lettura alla scrittura del genoma	221
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	222
Mappa concettuale 12 Editing genomico	224

Parte 4 L'ingegneria genetica in azione 225

13 L'analisi di geni, genomi e altri "omi"	227
13.1 L'analisi di struttura e funzione dei geni	227
13.1.1 Uno sguardo più da vicino alle sequenze	228
13.1.2 La ricerca di regioni importanti dei geni	228
13.1.3 L'analisi dell'espressione genica	231
13.2 La comprensione dei genomi	232
13.2.1 Analisi e mappatura dei genomi	233
13.2.2 Un'idea audace	235
13.2.3 Il Progetto Genoma Umano	237
13.2.4 Altri progetti sul genoma	241
13.3 Altri "omi"	241
13.3.1 Il trascrittoma	241
13.3.2 Il proteoma	244
13.3.3 Metabolomi, interattomi e oltre	244
13.4 La vita nell'era post-genomica	246
13.4.1 Genomica strutturale e proteomica	247
13.4.2 La genomica funzionale	247
13.4.3 La genomica comparativa	247
13.5 Conclusioni: il ruolo centrale del genoma	248
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	249
Mappa concettuale 13 L'analisi di geni, genomi e altri "omi"	252

14 Ingegneria genetica e biotecnologie	253
14.1 La produzione di proteine	254
14.1.1 Le proteine native e di fusione	255
14.1.2 I sistemi di espressione di lievito	256
14.1.3 Il sistema di espressione di baculovirus	257
14.1.4 Le linee cellulari di mammifero	258

14.2	L'ingegneria proteica	258
14.2.1	La progettazione razionale	258
14.2.2	L'evoluzione diretta	260
14.3	Dal laboratorio all'impianto di produzione	262
14.3.1	Pensare in grande: l'industria delle biotecnologie	262
14.3.2	I sistemi di produzione	264
14.3.3	Alcune considerazioni sull'aumento di scala	265
14.3.4	La lavorazione a valle	265
14.4	Esempi di applicazioni biotecnologiche della tecnologia dell'rDNA	266
14.4.1	La produzione di enzimi	266
14.4.2	La storia della BST	267
14.4.3	I prodotti terapeutici per l'assistenza sanitaria	269
14.4.4	La sfida della malattia COVID-19	273
14.5	Conclusioni: la biologia su scala industriale	275
	Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Lecture per approfondire	276

Mappe concettuali 14 Ingegneria genetica e biotecnologie

278

15	Le applicazioni mediche e forensi della manipolazione genica	279
15.1	Diagnosi e trattamento delle malattie	279
15.1.1	La diagnosi delle infezioni	279
15.1.2	I modelli di ereditarietà	280
15.1.3	Le malattie di origine genetica	282
15.1.4	L'analisi degli alleli malattia utilizzando la genomica comparativa	288
15.1.5	Lo sviluppo di vaccini utilizzando l'rDNA	288
15.1.6	Gli anticorpi terapeutici	288
15.1.7	Lo xenotrapianto	290
15.2	Il trattamento con la tecnologia dell'rDNA: la terapia genica	291
15.2.1	Il trasferimento dei transgeni nei pazienti	292
15.2.2	La terapia genica per il deficit di adenosina deaminasi	293
15.2.3	La terapia genica per la fibrosi cistica	294
15.2.4	Che cosa riserva il futuro per la terapia genica?	295
15.3	L'interferenza a RNA	296
15.3.1	Che cos'è l'RNAi?	296
15.3.2	L'utilizzo dell'RNAi come strumento per lo studio dell'espressione genica	297
15.3.3	L'RNAi come potenziale terapia	298
15.3.4	Gli oligonucleotidi antisenso	298
15.4	Le applicazioni mediche dell'editing genomico	299
15.4.1	Le malattie nel mirino dell'editing genomico	299
15.4.2	Il successo con le cellule falciformi	300
15.4.3	Le terapie con cellule CAR-T e CRISPR-Cas9 nel trattamento del cancro	301
15.4.4	La controversia su <i>CCR5</i>	302
15.5	DNA profiling	302
15.5.1	La storia del fingerprinting genetico	302
15.5.2	DNA profiling e analisi forense	304
15.5.3	I misteri del passato svelati da detective genetici	305

15.6 Conclusioni: l'rDNA per la diagnosi, l'analisi e la terapia	305
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	306

Mappa concettuale 15 Applicazioni mediche e forensi della manipolazione genica 309

16 Piante e animali transgenici	310
16.1 Un panorama complesso	310
16.2 Le piante transgeniche	312
16.1.2 Perché le piante transgeniche?	312
16.2.2 La produzione di piante transgeniche	312
16.2.3 La tecnologia al lavoro	316
16.2.4 Le piante transgeniche sono state soddisfacenti o deludenti?	322
16.3 Gli animali transgenici	323
16.3.1 Perché gli animali transgenici?	323
16.3.2 La produzione di animali transgenici	324
16.3.3 Le applicazioni della tecnologia degli animali transgenici	325
16.4 Le prospettive future	328
16.4.1 Transgenesi o editing genomico?	328
16.4.2 Il gene drive	329
16.5 Conclusioni: cambiare genomi e atteggiamenti	330
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	331

Mappa concettuale 16 Piante e animali transgenici 333

17 La clonazione	334
17.1 Prime idee ed esperimenti	335
17.1.1 I primi passi verso la clonazione	335
17.1.2 La totipotenza nucleare	336
17.2 Rane, rospi e carote	337
17.3 Una pecora famosa: la svolta raggiunta	339
17.4 Oltre Dolly	340
17.4.1 Un potenziale insoddisfatto?	342
17.4.2 Il futuro della clonazione di organismi	342
17.5 Conclusioni: dal genoma all'organismo	343
Parole chiave ▪ Attività di ricerca sul web ▪ Letture per approfondire	344

Mappa concettuale 17 Clonazione di organismi 346

Appendice 347

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

Indice analitico	386
------------------------	-----

Le risorse digitali

A questo indirizzo sono disponibili le risorse digitali di complemento al libro:

universita.zanichelli.it/nicholl

Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su **my.zanichelli.it** inserendo il codice di attivazione personale che si trova sull'etichetta adesiva nella prima pagina del libro.

Nel sito del libro è possibile guardare i **video delle tecniche di laboratorio**, ripassare con l'aiuto delle **flashcard**, trovare i link per i **test interattivi di autovalutazione**, accedere direttamente alla versione **Ebook**.

Le risorse digitali sono disponibili per chi acquista il libro nuovo. L'accesso all'Ebook e alle risorse digitali protette è personale, non condivisibile e non cedibile, né autonomamente né con la cessione del libro cartaceo.

L'app **laZ Guarda!**

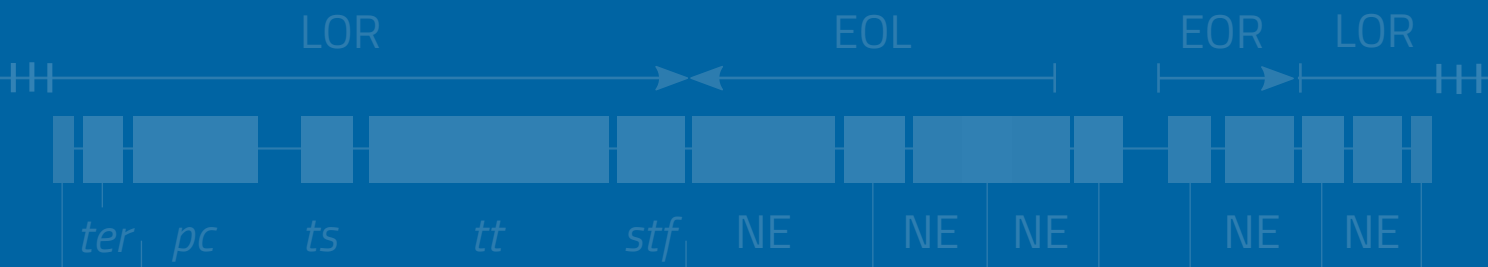


Con l'app **laZ Guarda!** si può accedere ai contenuti digitali in modo immediato usando un device portatile, come lo smartphone o il tablet. Inquadrando l'icona qui a lato si può accedere ai video, alle flashcard e ai test interattivi. L'app **laZ Guarda!** si scarica da App Store (sistemi operativi Apple) o da Google Play (sistemi operativi Android).

I video

I video disponibili nel sito del libro e attraverso l'app **laZ Guarda!** sono:

- Le caratteristiche delle micropipette
- La reazione a catena della polimerasi (PCR)
- PCR: termociclatore e master mix
- Elettroforesi di DNA su gel di agarosio
- Il clonaggio di un plasmide
- Coltura batterica su piastra Petri
- Realizzazione di un terreno selettivo
- Trasformazione di cellule con elettroporazione
- La trasformazione di cellule procariotiche con metodi chimici
- L'immunoblotting
- Identificare proteine con il Western blotting
- L'elettroforesi su gel in SDS
- Il sequenziamento del DNA
- Il sequenziamento con metodo dideossi (metodo Sanger)
- L'analisi del genoma dei Neanderthal con il pirosequenziamento
- Costrutti reporter
- Analisi di espressione genica tramite un array di oligonucleotidi
- Il sistema a doppio ibrido di lievito
- Sintesi di un array di oligonucleotidi
- La creazione di topi transgenici
- Come si fa il DNA fingerprinting
- Analisi genetica per l'anemia falciforme
- Trasformazione batterica con il gene dell'insulina
- Che cos'è CRISPR



Prefazione

I progressi nel campo della genetica procedono a un ritmo sempre più rapido, il che fa sorgere molti dilemmi quando si scrive un testo introduttivo sull'argomento. Negli anni trascorsi dalla pubblicazione della precedente edizione inglese di questa opera, sono state sviluppate molte nuove applicazioni per le tecnologie di manipolazione del DNA. Inoltre, il sequenziamento del genoma è diventato disponibile a costi compatibili con la "ricerca al bancone", e il genome editing può essere effettuato con strumentazioni di laboratorio economiche. La profilazione del genoma di singoli individui è oggi offerta da diverse aziende, e le tecnologie genetiche hanno svolto un ruolo fondamentale nella gestione di molti aspetti della pandemia di COVID-19, dai test diagnostici al rapido sviluppo di vaccini sicuri ed efficaci.

Le risorse informatiche, insieme a Internet e al World Wide Web, sono state componenti cruciali di tutti questi sviluppi, fornendo strumenti per l'analisi delle sequenze di DNA e la condivisione immediata dei dati a livello globale. Allo stesso tempo, in alcuni settori della società si è sviluppato un certo livello di sfiducia, in gran parte alimentato dalla disinformazione diffusa attraverso i social media, che ha mostrato il potere di Internet in una luce meno positiva. È in questo contesto che hanno iniziato a delinearci alcuni temi per questa edizione, con l'obiettivo di incoraggiare gli studenti e le studentesse a utilizzare le eccellenti risorse disponibili sul web, mantenendo però un atteggiamento critico nella valutazione delle informazioni.

Gli aspetti etici legati all'uso delle tecnologie genetiche sono forse oggi ancora più rilevanti che in passato; per questo motivo vengono trattati nelle prime parti del testo, così da permettere di collocare le applicazioni in un quadro di riferimento etico ben definito.

Pur puntando a un lieve ampliamento dell'ambito trattato, resto convinto che un'introduzione tecnica di base debba rimanere il fulcro principale del testo. Per questo motivo, alcuni dei metodi originariamente impiegati nella manipolazione del DNA sono stati mantenuti come esempi dello sviluppo storico della tecnologia, anche se oggi alcuni di essi sono poco utilizzati o addirittura obsoleti. Dal punto di vista didattico, ciò dovrebbe aiutare ad affrontare informazioni più avanzate sull'argomento, poiché una solida comprensione dei principi fondamentali rappresenta una componente essenziale di qualsiasi introduzione all'ingegneria genetica. Sono stato molto gratificato dai numerosi commenti positivi ricevuti sulla precedente edizione del testo e spero che anche questa nuova edizione continui a svolgere un ruolo utile nella formazione introduttiva a questo affascinante ambito.

Il libro è organizzato in quattro parti.

- La Parte 1 (*L'ingegneria genetica nel contesto; Capitoli 1–3*) introduce i concetti di base e affronta le questioni etiche legate alla tecnologia del DNA, in modo che siano anch'esse all'inizio del volume.
- La Parte 2 (*Le basi dell'ingegneria genetica; Capitoli 4–6*) contiene un'introduzione alla biologia molecolare e presenta gli strumenti a disposizione dell'ingegneria genetica.
- La Parte 3 (*I metodi di manipolazione genica; Capitoli 7–12*) approfondisce ulteriormente gli strumenti per modificare il DNA, mostrando che possono essere usati per svolgere esperimenti e procedure sofisticate.
- Infine, nella Parte 4 (*L'ingegneria genetica in azione; Capitoli 13–17*), si analizza l'impatto delle tecnologie del DNA in diversi ambiti.

In questa edizione ho ampliato la gamma di strumenti che possono risultare utili come supporto allo studio quando il testo viene utilizzato in un corso universitario. A fianco del testo dei capitoli sono presenti dei box che evidenziano i concetti chiave e possono essere utilizzati come una rapida sintesi per ripassare i contenuti. All'inizio di ciascun capitolo sono elencati quali **Obiettivi di apprendimento** generali è possibile raggiungere. È inoltre fornito un elenco delle **Parole chiave** di ciascun capitolo. Nel testo, tali termini sono evidenziati in grassetto; quelli in blu sono riportati anche nel **Glossario** a fondo volume.

Una novità introdotta alla fine di ogni capitolo è la sezione **Attività di ricerca sul web**, che propone esercizi strutturati e che fungono da punto di partenza per approfondire usando le risorse disponibili in rete. Per ogni capitolo è fornita una **Mappa concettuale** che occupa una pagina intera e che mostra le connessioni tra i principali argomenti trattati. Le mappe concettuali costituiscono essenzialmente un riassunto dei capitoli e possono essere consultate sia prima sia dopo la lettura.

Poiché si tratta di un testo introduttivo, non sono inseriti riferimenti bibliografici diretti alla letteratura primaria (di ricerca) all'interno del testo; tuttavia, alla fine di ciascun capitolo sono suggerite alcune letture di approfondimento. Molte di queste sono disponibili in formato open access o tramite l'abbonamento delle biblioteche universitarie.

Desmond S.T. Nicholl

Ringraziamenti

Ringrazio i revisori anonimi (ma sinceramente apprezzati) della proposta e delle prime versioni del manoscritto. I loro commenti e suggerimenti hanno migliorato il libro; eventuali errori di fatto o di interpretazione restano naturalmente di mia esclusiva responsabilità. Un ringraziamento speciale a Megan Keirnan, Susan Francis, Helen Shannon e Rachel Norridge della Cambridge University Press, e a Joyce Cheung, per i loro consigli sempre cordiali, il supporto, l'incoraggiamento e la pazienza che hanno contribuito a portare a termine il progetto.

Il mio ultimo e più grande ringraziamento va, come sempre, a mia moglie Linda e a Charlotte, Thomas e Anna, che sono cresciuti insieme alle varie edizioni di "IGE". A loro dedico questa nuova edizione.

1

Parte 1

L'ingegneria genetica nel contesto

- 1 Introduzione
- 2 La storia del DNA
- 3 Mondo nuovo o incubo genetico?



1

Introduzione

Obiettivi di apprendimento

Completato questo capitolo, sarai in grado di:

- definire l'ingegneria genetica come descritta in questo libro
- delineare le caratteristiche di base dell'ingegneria genetica
- descrivere come è nata la tecnologia della manipolazione genica
- spiegare i passaggi necessari per clonare un gene
- considerare gli elementi del dibattito etico sull'ingegneria genetica
- identificare una serie di risorse basate su Internet relative alla tecnologia del DNA

1.1 Che cos'è l'ingegneria genetica?

I progressi in qualsiasi disciplina scientifica dipendono dal continuo sviluppo di tecniche e metodi per estendere la gamma e la sofisticazione degli esperimenti che si possono eseguire. Nel contesto delle bioscienze, questo è stato dimostrato in modo spettacolare dalla nascita e dallo sviluppo dell'**ingegneria genetica**. Nel 2022 è ricorso il cinquantesimo anniversario della creazione delle prime molecole di DNA ricombinante, un evento che viene spesso utilizzato per segnare l'inizio dell'era del DNA ricombinante nella genetica. I cinque decenni dal 1972 hanno visto progressi sorprendenti nell'ampiezza e nella portata della tecnologia, ed è ora pratica di routine identificare uno specifico frammento di DNA dal genoma di un organismo, determinarne la sequenza di basi e valutarne la funzione. La sequenza può quindi essere modificata e reintrodotta nell'organismo da cui proviene, o in un organismo diverso, per uno scopo particolare. Abbiamo visto l'espansione della tecnologia nel dominio della *big science* nell'era del Progetto Genoma Umano e il suo ritorno alla ricerca di laboratorio su piccola scala con l'emergere di nuovi sviluppi. L'intero genoma può ora essere sequenziato con un'apparecchiatura da laboratorio e l'editing genomico consente l'alterazione del genoma di un organismo con un alto livello di precisione. Tutto ciò è supportato dagli sviluppi sorprendenti della **bioinformatica**, che fornisce sofisticati strumenti computazionali per analizzare quantità enormi di dati generati quotidianamente.

Il termine ingegneria genetica è spesso ritenuto piuttosto emotivo o addirittura banale, anche se è probabilmente la definizione più riconosciuta. Tuttavia,

In italiano il termine ingegneria genetica sottende spesso che le alterazioni introdotte nel materiale genetico di un organismo hanno lo scopo di *cambiarne il fenotipo* [NdC].

Sono usati diversi termini per descrivere le tecnologie coinvolte nella manipolazione genica.

Il materiale genetico fornisce una ricca risorsa sotto forma di informazioni codificate dalla sequenza di basi del DNA.

Il clonaggio genico consente l'isolamento e l'identificazione di singoli geni.

molti altri termini possono essere usati per descrivere la tecnologia, tra cui **manipolazione genica**, **clonaggio genico**, **tecnologia del DNA ricombinante (rDNA)** e **modifica genetica**. Ci si potrebbe anche imbattere nel termine **nuova genetica**, anche se siamo a un punto in cui è forse meno appropriato di quanto non fosse in precedenza. Un termine generico più utile che copre una vasta gamma di tecniche e applicazioni è semplicemente **tecnologia del DNA**. Esistono anche definizioni legali utilizzate nella gestione dei processi normativi nei Paesi in cui viene praticata l'ingegneria genetica.

Sebbene siano coinvolte molte tecniche diverse e complesse, i principi di base della manipolazione genetica sono abbastanza semplici. La premessa su cui si basa la tecnologia è che l'informazione genetica, codificata dal DNA e disposta sotto forma di geni, è una *risorsa* che può essere manipolata in vari modi per raggiungere determinati obiettivi sia nella scienza pura sia in quella applicata, nella medicina, nelle biotecnologie e nell'agricoltura. La manipolazione genetica ha avuto un impatto significativo in molti campi, tra cui:

- ricerca di base su struttura e funzione dei geni;
- nuovi metodi di produzione di proteine utili;
- generazione di piante e animali transgenici;
- diagnosi medica e trattamento;
- analisi forense di campioni da scene del crimine;
- antropologia molecolare e studio dell'evoluzione;
- analisi e editing del genoma.

Nei capitoli successivi, vedremo come la tecnologia del DNA ha contribuito in queste aree.

Il pilastro della manipolazione genetica è la capacità di isolare una singola sequenza di DNA dal genoma. Questa è l'essenza del clonaggio genico e può essere considerata come una serie di quattro passaggi (**Figura 1.1**). Il completamento di successo di questi passaggi fornisce una sequenza di DNA specifica, che può quindi essere utilizzata per una varietà di scopi. Ricorrendo a un'utile

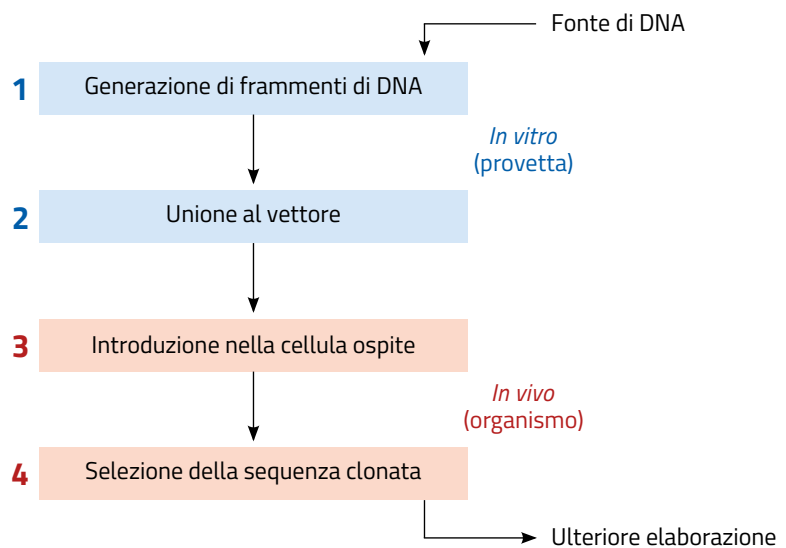


Figura 1.1 I quattro passaggi nel clonaggio di una sequenza di DNA. I passaggi 1 e 2 sono eseguiti *in vitro* e generano le molecole di DNA ricombinante. Un organismo ospite, come un batterio, viene utilizzato per i passaggi 3 e 4 (*in vivo*). Il termine *clone* si riferisce alle colonie di cellule ospiti identiche prodotte durante l'amplificazione dei frammenti clonati. La sequenza clonata può quindi essere isolata ed elaborata ulteriormente. Il clonaggio genico è talvolta detto anche clonaggio molecolare, un processo distinto dalla clonazione di interi organismi.

analogia, il clonaggio genico può essere considerato come una forma di **agricoltura molecolare**, che consente la produzione di grandi quantità (in ingegneria genetica, questo significa nanogrammi o microgrammi) di una particolare sequenza di DNA. Sebbene la metodologia di base del clonaggio sia stata ampliata (e in molti casi sostituita) da tecnologie come la reazione a catena della polimerasi, il sequenziamento del DNA su larga scala e l'editing genomico, la capacità di isolare una particolare sequenza genica è ancora una parte importante della manipolazione genica effettuata quotidianamente nei laboratori di ricerca di tutto il mondo.

Un aspetto dell'ingegneria genetica che ha destato preoccupazione è il dibattito sulle potenziali applicazioni della tecnologia. Il termine *genethics* (dalla fusione dei termini *genetics* ed *ethics*) è talvolta usato per descrivere i problemi etici legati alla genetica moderna, che probabilmente aumenteranno sia in numero sia in complessità mentre la tecnologia dell'ingegneria genetica diventerà sempre più sofisticata e diffusa. L'uso di piante e animali transgenici, l'analisi del genoma umano, la terapia genica, l'editing genomico e molti altri argomenti sono di interesse non solo per chi si occupa di scienza, ma anche per la popolazione generale. Gli sviluppi nella produzione di alimenti geneticamente modificati hanno provocato in molti Paesi una reazione pubblica ben documentata contro la tecnologia. I progressi nella clonazione di organismi e in settori come la fecondazione *in vitro* e lo xenotrapianto sollevano ulteriori domande. Sebbene non faccia strettamente parte della tecnologia di manipolazione genica, la clonazione di organismi sarà presa in considerazione più avanti in questo testo, poiché è un'area di grande interesse e può essere considerata come ingegneria genetica nel suo senso più ampio. La ricerca sulle cellule staminali embrionali, con i potenziali benefici terapeutici che può apportare, è un'altra area di interesse che contribuisce al progresso generale della genetica. Esamineremo alcuni di questi aspetti etici in modo più dettagliato nel Capitolo 3.

Oltre alle sfide tecniche e scientifiche, la genetica moderna pone molte questioni morali ed etiche.

1.2 Le basi della genetica molecolare

Sebbene le tecniche di manipolazione genica abbiano iniziato ad apparire intorno al 1970, dovremmo ricordare che il loro sviluppo è scaturito dalle conoscenze e dalle competenze fornite da chimici, biochimici e genetisti microbiologi dei primi decenni del XX secolo. Possiamo suddividere lo sviluppo della genetica in tre ere principali (Figura 1.2). La scienza della genetica iniziò con la riscoperta del lavoro di **Gregor Mendel** all'inizio del XX secolo, e i successivi 40 anni videro l'elucidazione dei principi di ereditarietà e mappatura genetica. La genetica microbica si affermò a metà degli anni Quaranta del secolo scorso con la conferma del ruolo del DNA come materiale genetico. Durante questo periodo, si fecero grandi progressi nella comprensione dei meccanismi di trasferimento genico tra i batteri e fu stabilita un'ampia base di conoscenze, da cui sarebbero emersi sviluppi successivi.

Gregor Mendel è spesso considerato il "padre" della genetica.

La determinazione della struttura del DNA da parte di **James Watson** e **Francis Crick** nel 1953 fornì lo stimolo per lo sviluppo della genetica a livello molecolare e gli anni successivi rappresentarono un periodo di intensa attività ed entusiasmo, con la determinazione delle caratteristiche principali del gene e della sua espressione. Questo lavoro culminò nella decifrazione del codice genetico completo nel 1966, ponendo le basi per le nuove scoperte che avrebbero portato allo sviluppo delle prime tecniche nella tecnologia del DNA ricombinante.

La doppia elica di Watson e Crick è forse la molecola più famosa e più facilmente riconoscibile al mondo.

5

Gli strumenti del mestiere

Obiettivi di apprendimento

Completato questo capitolo, sarai in grado di:

- delineare la gamma di enzimi usati nella manipolazione genica
- descrivere la modalità di azione e gli usi degli enzimi di restrizione di tipo II
- confrontare la modalità di azione e gli usi di una serie di enzimi di modifica del DNA, tra cui endonucleasi, esonucleasi, polimerasi ed enzimi che ne modificano le estremità
- definire la modalità di azione e l'uso della DNA ligasi

Nel Paragrafo 2.1, abbiamo visto che la scienza ha bisogno sia di una *metodologia* (Figura 2.1) sia di un'*infrastruttura* (Figura 2.2) per poter compiere progressi. Ora dobbiamo considerare come questi due aspetti sono realizzati quando si studia il DNA. In questo capitolo, esamineremo quella che potremmo chiamare la “metodologia biologica” necessaria per manipolare il DNA, prima di approfondire le procedure tecnologiche nel Capitolo 6.

La capacità di tagliare e unire il DNA da diverse fonti è l'essenza della creazione di DNA ricombinante (rDNA) in provetta. Inoltre, potrebbe essere necessario effettuare alcune modifiche al DNA durante le varie fasi per produrre, clonare e identificare le molecole di rDNA. Gli strumenti che consentono di eseguire queste manipolazioni sono gli **enzimi**, quasi sempre molecole proteiche grandi e complesse (anche se ci sono alcuni enzimi a RNA noti come **ribozimi**). Possono essere isolati da una vasta gamma di organismi e sono disponibili in commercio da vari fornitori; queste aziende sono una parte fondamentale del settore che fornisce infrastrutture di supporto per consentire di lavorare con rDNA. In questo capitolo, vedremo alcune delle importanti classi di enzimi che compongono il kit di strumenti per l'ingegneria genetica.

5.1 Gli enzimi di restrizione: il taglio del DNA

Gli **enzimi di restrizione**, che tagliano il DNA in siti specifici, rappresentano uno dei più importanti gruppi di enzimi per la manipolazione del DNA. Questi enzimi si trovano nelle cellule batteriche, dove funzionano come parte di un meccanismo protettivo chiamato **sistema di restrizione-modifica**. In questo

sistema, l'enzima di restrizione idrolizza qualsiasi DNA esogeno che appare nella cellula. Per impedire all'enzima di agire sul DNA della cellula ospite, l'enzima di modifica del sistema (una metilasi) determina la **metilazione** del DNA ospite su particolari basi nella **sequenza di riconoscimento** dell'enzima di restrizione, impedendo così all'enzima di tagliare il DNA. A volte la metilazione di un singolo filamento (**emimetilazione**) è sufficiente per prevenire il taglio. Gli enzimi di restrizione possono essere classificati in diversi tipi (I, II, III, IV o V), che differiscono per il meccanismo d'azione, i requisiti di cofattori e la relazione tra sito di riconoscimento e punto di taglio del DNA. Le caratteristiche chiave di ciascun tipo sono mostrate nella **Tabella 5.1**.

Gli enzimi comunemente usati nella manipolazione genica sono solitamente enzimi di tipo II, che hanno la modalità di azione più semplice in quanto tagliano il DNA nel sito di riconoscimento. Questi enzimi sono **nucleasi** e, poiché tagliano in una posizione interna in un filamento di DNA (invece che iniziare la degradazione a un'estremità), sono noti come **endonucleasi**. Pertanto, la corretta definizione di questi enzimi è *endonucleasi di restrizione di tipo II*, sebbene siano spesso semplicemente chiamati enzimi di restrizione. In sostanza, possono essere pensati come forbici molecolari.

5.1.1 Le endonucleasi di restrizione di tipo II

La nomenclatura degli enzimi di restrizione si basa su una serie di convenzioni. I nomi di genere e specie dell'organismo in cui si trova l'enzima sono utilizzati per fornire la prima parte della denominazione, che comprende la prima lettera del nome del genere e le prime due lettere del nome della specie. Pertanto, un enzima da un ceppo di *Escherichia coli* è chiamato *Eco*, uno da *Bacillus amyloliquefaciens* è *Bam*, e così via. È possibile aggiungere ulteriori descrittori,

Gli enzimi di restrizione agiscono come un sistema di protezione per i batteri, idrolizzando il DNA esogeno che non è metilato dall'enzima di modifica dell'ospite.

Gli enzimi di restrizione sono denominati in base al batterio da cui vengono purificati.

Tabella 5.1 Proprietà generali degli enzimi di restrizione.

Tipo	Caratteristiche
I	Primi enzimi di restrizione scoperti. Sono grandi, hanno funzioni combinate di restrizione/modifica e sequenze di riconoscimento (SR) asimmetriche. I siti di taglio (ST) sono siti casuali a circa 1000 bp dalla SR. Di uso limitato nella manipolazione genica
II	Utilizzati di routine. Raggruppati in diversi sottotipi, a seconda delle caratteristiche specifiche. Il tipo IIP (spesso chiamato solo tipo II) è il più comune. Questi enzimi riconoscono una SR palindromica invertita e tagliano al suo interno. Altri tipi riconoscono una SR asimmetrica e/o possono tagliare alcune paia di basi dal sito, oppure possono tagliare entrambe le estremità della SR. Uno dei sottotipi più utili è il IIS. Questi enzimi hanno due domini, uno per il riconoscimento e uno per il taglio. Riconoscono una SR asimmetrica e tagliano a poche paia di basi da questa. Sono diventati una parte fondamentale di un metodo di clonaggio chiamato Golden Gate (Paragrafo 8.4.5)
III	Gli enzimi di tipo III sono grandi sistemi combinati di restrizione-modifica e tagliano circa 20 bp dalla SR. Richiedono due SR invertite e spesso non tagliano completamente il DNA
IV	Tagliano regioni modificate come il DNA metilato
V	Il sistema enzimatico Cas (proteina associata a CRISPR) è considerato una forma di enzima di restrizione che utilizza RNA guida per tagliare il DNA. Più noto come sistema di editing CRISPR-Cas9 (Capitolo 12)
Artificiale	Gli enzimi possono essere ingegnerizzati combinando un dominio di riconoscimento del DNA con un dominio nucleasico funzionale. Questo approccio apre alla progettazione di sequenze di riconoscimento specifiche che possono essere utilizzate per una manipolazione molto precisa delle sequenze geniche. Esempi includono nucleasi a dito di zinco, TALEN e il sistema CRISPR-Cas9 (Paragrafo 5.2.1 e Capitolo 12)

Diversi enzimi di restrizione generano frammenti di DNA con diversa estensione; la lunghezza dei frammenti dipende dalla frequenza di occorrenza della sequenza di riconoscimento.

a seconda del ceppo batterico coinvolto e della presenza o assenza di elementi extracromosomici. Due enzimi ampiamente utilizzati dai batteri menzionati prima sono *EcoRI* e *BamHI*. Il legame di *BamHI* alla sua sequenza di riconoscimento è mostrato nella **Figura 5.1**.

Il valore delle endonucleasi di restrizione risiede nella loro specificità. Ogni particolare enzima riconosce una determinata sequenza di basi nel DNA: le sequenze di riconoscimento più comuni sono costituite da quattro, cinque o sei paia di basi. Pertanto, dato che ci sono quattro basi nel DNA e assumendo una loro distribuzione casuale, la frequenza prevista di qualsiasi particolare sequenza può essere calcolata come 4^n , dove n è la lunghezza della sequenza di riconoscimento. Ciò prevede che i siti tetranucleotidici si verifichino ogni 256 paia di basi, i siti pentanucleotidici ogni 1024 paia di basi e i siti esanucleotidici ogni 4096 paia di basi. Si può riscontrare una notevole variazione da questi valori, ma generalmente le lunghezze dei frammenti prodotti si troveranno intorno al valore calcolato. Pertanto, un enzima che riconosce una sequenza tetranucleotidica produrrà frammenti di DNA più corti di uno che taglia una sequenza esanucleotidica, quando il DNA viene digerito completamente con l'enzima.

I siti di riconoscimento sono generalmente **palindromi** (si leggono allo stesso modo in un senso e nell'altro). Molto spesso, sono **palindromi invertite** in cui la sequenza si legge allo stesso modo su ciascuno dei due filamenti di DNA (per esempio 5'-GAATTC-3' e il suo complementare), piuttosto che **palindromi speculari** in cui una sequenza è palindromica su un singolo filamento (per esempio 5'-TAGGAT-3'). Alcuni degli enzimi di restrizione più comunemente utilizzati sono elencati nella **Tabella 5.2**, con le loro sequenze di riconoscimento e i siti di taglio.

5.1.2 L'uso delle endonucleasi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono molto semplici da usare: una quantità appropriata di enzima viene aggiunta al DNA target in una soluzione tampone e la reazione viene incubata alla temperatura ottimale (di solito 37 °C) per un periodo di tempo adeguato. L'attività enzimatica è espressa in unità, dove una unità è la quantità di enzima che taglia 1 µg di DNA in 1 ora a 37 °C. Anche se la maggior parte degli esperimenti richiede una digestione completa del DNA target, in certi casi varie combinazioni di concentrazione enzimatica e tempo di incubazione possono essere utilizzate per limitare la quantità di digestione. Queste *digestioni parziali* si possono eseguire per consentire la frammentazione del

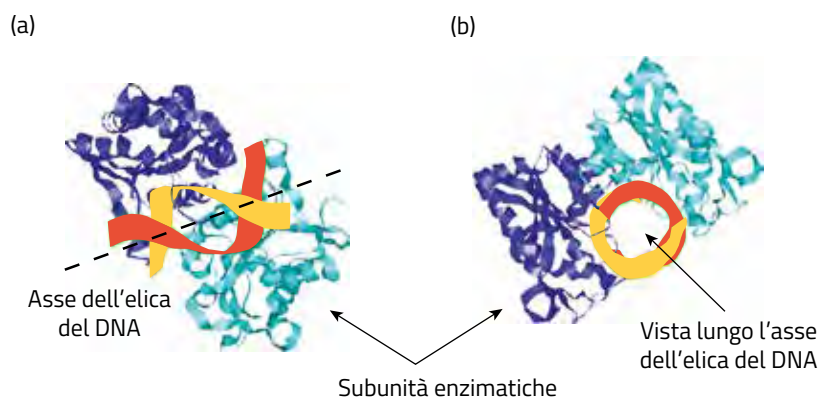


Figura 5.1 Legame dell'enzima di restrizione *BamHI* all'elica del DNA. È mostrato come l'enzima avvolge l'elica per facilitare l'idrolisi dei legami fosfodiesterici. (a) e (b) presentano viste diverse rispetto all'asse dell'elica. Questo modello illustra la relazione molto stretta tra struttura e funzione in biologia. Generato utilizzando il software per modelli molecolari *RasMol*. Fonte: Roger Sayle, Public Domain.

Tabella 5.2 Sequenze di riconoscimento e siti di taglio per alcune endonucleasi di restrizione.

Enzima	Organismo di origine	Sequenza di riconoscimento	Siti di taglio	Estremità
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5' - GGATCC - 3'	G [↓] GATCC CCTAG [↓] G	5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5' - GAATTC - 3'	G [↓] AATTC CTTAA [↓] G	5'
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' - GGCC - 3'	GG [↓] CC CC [↓] GG	Piatte
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5' - GTTAAC - 3'	GTT [↓] AAC CAA [↓] TTG	Piatte
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	5' - CTGCAG - 3'	CTGCA [↓] G G [↓] ACGTC	3'
<i>Sac</i> I ^a	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5' - GAGCTC - 3'	GAGCT [↓] C C [↓] TCGAG	3'
<i>Sau</i> 3A	<i>Staphylococcus aureus</i>	5' - GATC - 3'	GATC CTAG [↓]	5'
<i>Sma</i> I ^b	<i>Serratia marcescens</i>	5' - CCCGGG - 3'	CCC [↓] GGG GGG [↓] CCC	Piatte
<i>Sst</i> I ^a	<i>Streptomyces stanford</i>	5' - GAGCTC - 3'	GAGCT [↓] C C [↓] TCGAG	3'
<i>Xma</i> I ^b	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	5' - CCCGGG - 3'	C [↓] CCGGG GGGCC [↓]	5'

Nota: Le sequenze di riconoscimento sono fornite in forma di singolo filamento, scritte in direzione 5'→3'. I siti di taglio sono mostrati nel doppio filamento per illustrare il tipo di estremità prodotte da un particolare enzima; 5' e 3' si riferiscono rispettivamente alle estremità sporgenti in 5' e in 3'. Il punto in cui i legami fosfodiesterici sono rotti è mostrato dalla punta di freccia rossa su ciascun filamento della sequenza di riconoscimento. Si noti che alcuni enzimi (mostrati a colori) riconoscono la stessa sequenza: ^a*Sac*I e *Sst*I sono **isoschizomeri** (tagliano nelle stesse posizioni nella sequenza di riconoscimento) e ^b*Sma*I e *Xma*I sono **neoschizomeri** (tagliano in posizioni diverse nella sequenza di riconoscimento). Diverse centinaia di enzimi di restrizione di tipo II sono disponibili in commercio. Molti di questi sono prodotti dall'espressione del gene clonato in *E. coli*, piuttosto che per isolamento diretto dall'organismo di origine.

DNA in modo pseudo-casuale, che può essere utile nella generazione di librerie genomiche (Paragrafo 8.2.1).

Il tipo di frammento di DNA che un particolare enzima produce dipende dalla sequenza di riconoscimento e dalla posizione del sito di taglio all'interno di questa sequenza. Come abbiamo già visto, la lunghezza dei frammenti dipende dalla frequenza di occorrenza della sequenza di riconoscimento. Il sito di taglio effettivo dell'enzima determinerà il tipo di estremità del frammento tagliato, che è importante per l'ulteriore manipolazione del DNA. Si possono produrre tre tipi di frammenti: con **estremità piatte**, con estremità sporgenti in 3' e con estremità sporgenti in 5'. Un esempio di ciascun tipo è mostrato nella **Figura 5.2**.

Enzimi come *Pst*I ed *Eco*RI generano frammenti di DNA con **estremità coesive** o "appiccicose", poiché le sequenze sporgenti possono appaiarsi con sequenze complementari generate dallo stesso enzima. Pertanto, tagliando due diversi campioni di DNA con lo stesso enzima e mescolando insieme i frammenti, si può produrre rDNA, come mostrato nella **Figura 5.3**. Questa è una delle applicazioni più utili degli enzimi di restrizione ed è una parte fondamentale di molte manipolazioni nell'ingegneria genetica.

Una caratteristica molto utile degli enzimi di restrizione è che possono generare estremità coesive o "appiccicose" che possono essere utilizzate per unire il DNA da due fonti diverse e generare molecole di DNA ricombinante.

8

Le strategie di clonaggio

Obiettivi di apprendimento

Completato questo capitolo, sarai in grado di:

- delineare la gamma di strategie che possono essere impiegate per clonare cDNA e DNA genomico
- descrivere il rationale e la metodologia per la generazione di librerie genomiche e di cDNA
- spiegare come la PCR, la bioinformatica e la sintesi dei geni hanno contribuito allo sviluppo della tecnologia di clonaggio
- spiegare come i frammenti di DNA possono essere uniti ai vettori
- riassumere la gamma di metodi di clonaggio disponibili, inclusi metodi senza l'uso di enzimi di restrizione per il subclonaggio e l'assemblaggio dei frammenti

Un protocollo di clonaggio genico include quattro passaggi: la *generazione* di frammenti di DNA, l'*unione* dei frammenti a un vettore adatto per produrre DNA ricombinante, la *propagazione* dei ricombinanti in una cellula ospite e l'*identificazione* e la *selezione* della sequenza desiderata (Figura 1.1). In questo capitolo, esamineremo alcune delle strategie che possono essere utilizzate per svolgere i primi due di questi passaggi, concentrandoci principalmente sul clonaggio di sequenze eucariote. La scelta del sistema vettore/ospite per il clonaggio predeterminerà le strategie possibili per introdurre il DNA ricombinante nella cellula ospite, utilizzando uno dei metodi che abbiamo esaminato nel Paragrafo 7.5. Vedremo anche come la **PCR (reazione a catena della polimerasi)**, discussa in dettaglio nel Capitolo 9) e la disponibilità di **dati di sequenza genomica** quasi completi per molti organismi hanno cambiato l'approccio strategico al clonaggio. La selezione delle sequenze clonate sarà trattata nel Capitolo 10.

8.1 Qual è l'approccio migliore?

La complessità di qualsiasi strategia di clonaggio dipende da una serie di fattori, alcuni comuni a tutti i protocolli, altri specifici per applicazioni particolari. Una strategia per isolare e sequenziare un frammento di DNA relativamente piccolo da *Escherichia coli* sarà diversa da una strategia per produrre una proteina ricombinante in un organismo transgenico eucariote. Ogni progetto sarà

Per completare i quattro passaggi chiave e ottenere un risultato positivo in una procedura di clonaggio, è necessario avere inizialmente una chiara strategia generale.

quindi unico e presenterà il proprio insieme di problemi che devono essere affrontati scegliendo il percorso appropriato nel labirinto di possibilità. Alcune domande chiave da considerare sono:

- qual è l'obiettivo generale della procedura?
- quanto è già noto sulla/e sequenza/e target?
- è necessaria una procedura di clonaggio o esiste un'alternativa?
- qual è il materiale di origine più appropriato, DNA genomico o mRNA?
- è disponibile un sistema vettore/ospite adeguato?

Sebbene queste domande rimangano rilevanti per la progettazione di un sistema sperimentale efficace, le risposte sono cambiate man mano che la tecnologia di clonaggio è diventata più sofisticata. Iniziamo aggiungendo un contesto storico sulla linea temporale della genomica che abbiamo considerato nella Figura 1.4.

8.1.1 Il clonaggio nell'era pre-genomica

L'obiettivo di una procedura di clonaggio nell'era pre-genomica era di solito abbastanza ben definito. Nella maggior parte dei casi, si conosceva molto poco della sequenza del gene in studio; l'interesse poteva essere stato stimolato dal desiderio di comprendere meglio una particolare malattia o di indagare la struttura e la funzione di una proteina. Le sonde molecolari possono essere progettate sfruttando informazioni parziali sulla sequenza proteica o dati comparativi da altri organismi, se disponibili. A partire dalla fine degli anni Settanta, il sequenziamento del DNA iniziò a svolgere un ruolo sempre più importante. Tuttavia, nel periodo pre-genomico la maggior parte dei progetti di clonaggio prevedeva ancora la costruzione di collezioni di cloni da cui isolare il gene di interesse. Questi “banche di cloni” sono archivi noti come **librerie genomiche** o **librerie di cDNA**.

Sebbene il DNA di queste librerie rappresenti il genoma completo di un organismo, esso contiene anche sequenze non codificanti, quali introni, regioni regolative e sequenze ripetute. Questo può talvolta creare difficoltà se l'obiettivo è isolare un gene a copia singola, soprattutto nei genomi di grandi dimensioni. Se invece l'interesse principale riguarda il controllo dell'espressione genica, bisogna isolare le sequenze regolative corrispondenti, che si trovano ovviamente nel DNA genomico.

L'RNA messaggero presenta due vantaggi rispetto al DNA genomico come materiale di partenza. In primo luogo, è una componente del trascrittoma, ossia l'insieme delle molecole di RNA espresse nel particolare tipo cellulare da cui viene isolato (l'mRNA è spesso definito complessivamente **esoma**, l'insieme degli esoni in un genoma; sarà esaminato in modo più dettagliato nel Capitolo 13). Questo può essere un potente meccanismo di selezione preliminare, poiché non tutto il DNA genomico sarà rappresentato nella popolazione di mRNA. Inoltre, se il gene di interesse è altamente espresso, questo può riflettersi nell'abbondanza del suo mRNA rendendo più facile l'isolamento dei cloni. Un secondo vantaggio dell'mRNA è che, per definizione, rappresenta la sequenza codificante del gene, perché eventuali introni sono stati rimossi durante il processamento dell'RNA. Pertanto, la produzione di una proteina ricombinante è molto più semplice se è disponibile un clone di mRNA.

Ogni procedura di clonaggio è unica e presenta una serie di sfide che devono essere superate selezionando le tecniche appropriate; questo è spesso reso più semplice dall'utilizzo di un kit ottimizzato da un singolo fornitore.

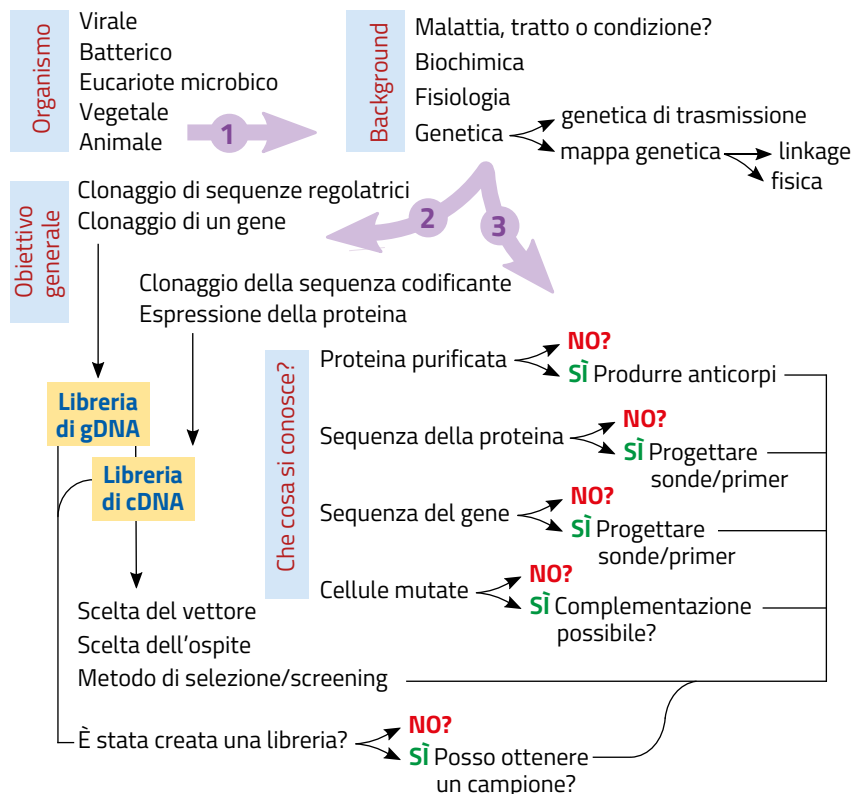
Alcuni dei fattori coinvolti nella produzione di librerie genomiche o di cDNA sono mostrati nella **Figura 8.1**. Inizialmente, protocolli e metodi venivano sviluppati e ottimizzati in ciascun laboratorio. Con il tempo l'affidabilità delle tecniche si consolidò: ogni gruppo di ricerca sviluppò competenze in una particolare area ed erano felici di condividerle con altri. In molti casi, i laboratori si scambiavano singoli cloni o intere librerie, in un approccio noto come “*cloning by phoning*”.

8.1.2 Il clonaggio (o no) nelle ere genomica e post-genomica

Oltre ai miglioramenti generali della metodologia, due elementi ebbero un impatto significativo sulle strategie di clonaggio dei primi anni Ottanta del secolo scorso. In primo luogo, l'uso del sequenziamento del DNA si affermò stabilmente e il passaggio a progetti di sequenziamento a livello genomico portò a un aumento esponenziale della quantità di dati di sequenza generati. In secondo luogo, lo sviluppo della PCR nel 1983 fu un evento rivoluzionario che, in alcuni casi, eliminava la necessità di un protocollo di clonaggio. Anche lo sviluppo di Internet e del World Wide Web e l'emergere della **bioinformatica** come disciplina (Capitolo 11) svolsero un ruolo fondamentale nel passaggio a un approccio molto più basato sull'informatica per l'analisi del DNA. Un altro cambiamento di passo si verificò con lo sviluppo di metodi di sequenziamento di nuova generazione (Paragrafo 6.8.1), così che il sequenziamento del genoma ad alto rendimento divenne ampiamente disponibile e conveniente. In un arco di tempo abbastanza breve, la domanda chiave divenne quindi «che cosa è già noto sulla sequenza?» come punto di partenza per ideare un protocollo di clonaggio.

Sebbene le librerie genomiche e di cDNA rimangano una parte importante della tecnologia di clonaggio, la gamma di strumenti informatici disponibili

Figura 8.1 Fattori da considerare nell'elaborazione di una strategia di clonaggio nell'era pre-genomica. Le principali aree da considerare quando si progetta una strategia di clonaggio “tradizionale” sono le caratteristiche dell'organismo e quali conoscenze di base esistono (freccia grande 1). A partire da questo, l'obiettivo generale del protocollo determinerà se l'opzione migliore è il DNA genomico (libreria di gDNA) o l'mRNA (libreria di cDNA) (freccia grande 2). È necessario considerare i dettagli di ciò che è già noto sul gene/proteina (freccia grande 3). Questo sarà utile sia per la strategia di clonaggio sia per il metodo che può essere utilizzato per lo screening o la selezione dei cloni dalla libreria. Quando appare un “no” (NO?), le opzioni sono scegliere un percorso diverso o condurre indagini nell'area in cui mancano informazioni, per esempio se la proteina non è stata purificata, può essere necessario farlo per generare dati di sequenza per progettare sonde o primer (magari per il sequenziamento del DNA e/o la PCR, che si stavano affermando negli anni Ottanta del secolo scorso). Sebbene molte di queste domande e protocolli siano stati superati grazie ai progressi più recenti, se si sta indagando su un nuovo organismo o tratto, potrebbe essere ancora necessario progettare una procedura per generare una banca di cloni e isolare direttamente una sequenza genica.



9

La reazione a catena della polimerasi

Obiettivi di apprendimento

Completato questo capitolo, sarai in grado di:

- delineare la storia e i principi alla base della PCR
- descrivere la tecnica di amplificazione mediante PCR
- dimostrare la gamma di varianti di PCR, tra cui quella annidata, inversa, quantitativa e digitale
- illustrare le applicazioni della PCR e l'elaborazione dei prodotti della PCR

L'argomento di questo capitolo è la **reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction)**, per la cui scoperta **Kary Mullis** è stato insignito del premio Nobel per la chimica nel 1993. La tecnica della PCR produce un risultato simile al clonaggio del DNA – l'amplificazione selettiva di una sequenza di DNA – ed è diventata una parte così importante del kit di strumenti dell'ingegneria genetica che, per molte applicazioni, ha essenzialmente sostituito il clonaggio tradizionale. In questo capitolo, esamineremo alcune delle tecniche e delle applicazioni della PCR.

9.1 La storia della PCR

Oltre a richiedere una scintilla di genio, le principali scoperte scientifiche dipendono dalle conoscenze esistenti, dalle tecniche disponibili e spesso da un po' di fortuna. In genetica e biologia molecolare, ci sono stati molti esempi di scienziati che si trovavano nel posto giusto, con la giusta "mentalità", indagando sul problema giusto e arrivando a una scoperta fondamentale. Gregor Mendel, James Watson e Francis Crick sono tre nomi che spiccano; Kary Mullis può essere legittimamente aggiunto alla lista. Nel 1979 entrò a far parte della Cetus Corporation, con sede a Emeryville, in California. In quel momento, i prerequisiti essenziali per lo sviluppo della PCR erano stati stabiliti. Mullis stava lavorando alla sintesi degli oligonucleotidi, che all'inizio degli anni Ottanta del secolo scorso era diventata un processo automatizzato e un po' noioso. Pertanto, la sua mente era libera di indagare su altro. Con le sue stesse parole, si ritrovò a «divagare sugli oligonucleotidi», e la motivazione principale era cercare di sviluppare una versione modificata della procedura di sequenziamento con

Le principali scoperte scientifiche richiedono che una serie di elementi si uniscano al momento giusto; la scoperta della PCR ne è un buon esempio.

La premessa di base della PCR è abbastanza semplice: si utilizzano due primer in modo che ogni filamento di DNA serva da stampo, e quindi il numero di filamenti di DNA raddoppia a ogni ciclo della PCR.

Come per molte nuove tecnologie, negli ultimi 40 anni la PCR si è sviluppata in molte varianti, ognuna con la propria applicazione specifica.

i dideoossi. I suoi pensieri erano quindi occupati da **oligonucleotidi**, **stampi di DNA** e **DNA polimerasi**.

Un venerdì sera tardi, nell'aprile del 1983, Mullis stava guidando verso il suo cottage con un amico e pensava ai suoi esperimenti di sequenziamento modificato. Stava infatti cercando di stabilire se l'estensione dei primer oligonucleotidici da parte della DNA polimerasi potesse essere utilizzata per "ripulire" i dNTP indesiderati nella soluzione, che altrimenti avrebbero ostacolato il suo esperimento con i dideoossi. Improvvisamente, si rese conto che se fossero stati coinvolti *due* primer e fossero serviti per l'estensione degli stampi di DNA, la sequenza sarebbe stata effettivamente duplicata. Fortunatamente, aveva anche scritto programmi per computer che richiedevano cicli ripetitivi e si rese conto che la ripetizione sequenziale della sua reazione di copiatura (anche se non di quello che intendeva nel suo sistema sperimentale!) poteva fornire molte copie della sequenza del DNA. Alcuni veloci controlli dei dati confermarono che l'aumento esponenziale raggiunto era effettivamente di 2^n , dove n è il numero di cicli. La PCR era stata scoperta.

Il lavoro successivo dimostrò che la teoria funzionava se applicata a una varietà di stampi di DNA. Mullis presentò il suo lavoro in un poster all'annuale Cetus Scientific Meeting nella primavera del 1984. Nel suo resoconto della scoperta della PCR su *Scientific American* (aprile 1990), ricorda come **Joshua Lederberg** discusse i suoi risultati e sembrò reagire in un modo che sarebbe diventato familiare: il «perché non ci ho pensato io» di quando si riconosce una scoperta che è brillante nella sua semplicità.

Negli ultimi 40 anni, la tecnica della PCR è stata adottata in modo simile alla tecnologia del DNA ricombinante stessa. Si è ampiamente affermata nei primi anni Novanta del secolo scorso, con un numero di articoli pubblicati ogni anno decuplicato dal 1990 al 1994. Nuove versioni della tecnica continuano a essere sviluppate, e ora ne sono disponibili circa 40 per una vasta gamma di applicazioni. Ne descriveremo solo alcune in questo capitolo; parte dell'*Attività di ricerca sul web* sarà quella di estendere lo studio per esaminare alcuni dei metodi più particolari basati sulla PCR.

9.2 La tecnica della PCR

La PCR è elegantemente semplice nella teoria. Quando un duplex di DNA viene riscaldato, i filamenti si separano o si "fondono/sciolgono" (*melting*). Se le sequenze a singolo filamento possono essere copiate da una DNA polimerasi, la sequenza di DNA originale viene duplicata. Quando il processo viene ripetuto molte volte, si ha un aumento esponenziale del numero di copie della sequenza di partenza. La lunghezza del frammento è definita dalle estremità 5' dei primer e questo aiuta a garantire la produzione di una popolazione omogenea di molecole di DNA. Pertanto, dopo relativamente pochi cicli (spesso intorno ai 30), la sequenza target viene notevolmente amplificata, generando una quantità sufficiente per l'identificazione e l'ulteriore elaborazione. Il metodo di base, in cui i prodotti vengono analizzati alla fine del processo, è per questo anche detto **end-point PCR**.

9.2.1 Le caratteristiche essenziali della PCR

Oltre a una sequenza di DNA per l'amplificazione, ci sono due requisiti per la PCR. In primo luogo, è necessario un **primer** adatto. Per la maggior parte delle

applicazioni sono necessari *due* primer, uno per ogni filamento del duplex. I primer dovrebbero affiancare la sequenza target, quindi sono necessarie alcune informazioni sulla sequenza se si desidera ottenere l'amplificazione selettiva. I primer vengono sintetizzati come oligonucleotidi e aggiunti alla reazione in eccesso, in modo che ciascuno dei primer sia sempre disponibile dopo la fase di denaturazione. Un secondo requisito è una forma adatta di DNA polimerasi. Sebbene sia possibile utilizzare una DNA polimerasi standard (come fatto nei primi tempi della PCR), questa viene inattivata nella fase di denaturazione con il calore e quindi, dopo ogni ciclo di funzionamento, deve essere aggiunto un enzima fresco. La disponibilità di **DNA polimerasi termostabili** rende la vita molto più facile (Paragrafo 9.2.3).

L'uso di una polimerasi termostabile permette l'automazione della procedura, in quanto non è necessario aggiungere polimerasi fresca dopo ogni fase di denaturazione. Oltre a DNA, primer e polimerasi, è necessario avere la consueta miscela della corretta soluzione tampone e i quattro dNTP per garantire che la produzione di copie dei filamenti di DNA non sia bloccata a causa dell'inattivazione dell'enzima o della mancanza di monomeri.

Nel suo funzionamento, la PCR è semplice. Il DNA target e i componenti della reazione vengono solitamente miscelati all'inizio del processo e la provetta è riscaldata a circa 90 °C per denaturare il DNA. Quando la temperatura scende, i primer si appaieranno alle loro sequenze target sul DNA a singolo filamento e la polimerasi inizierà a copiare i filamenti stampo. Il ciclo viene completato (e riavviato) da un'ulteriore fase di denaturazione. La sequenza operativa è mostrata nella **Figura 9.1**.

L'automazione del ciclo operativo della PCR si ottiene utilizzando un sistema di riscaldamento programmabile noto come **termociclatore**, che richiede

I requisiti chiave per la PCR sono uno stampo di DNA, una coppia di primer oligonucleotidici adatti e una DNA polimerasi.

La PCR è in sostanza una semplice serie di passaggi definiti che vengono ripetuti molte volte. Ciò significa che il processo può essere automatizzato facilmente con una tecnologia relativamente semplice.

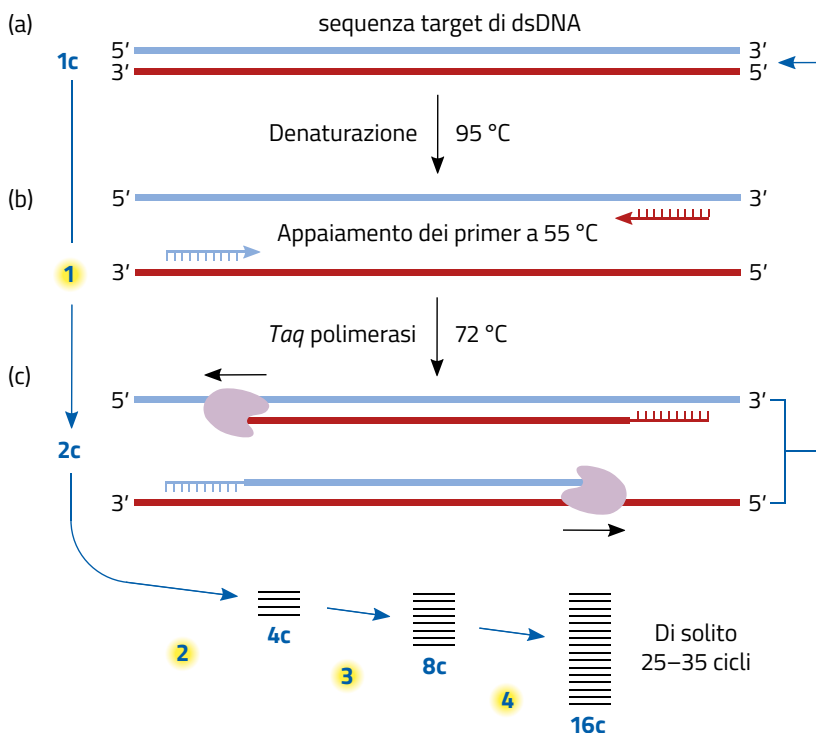
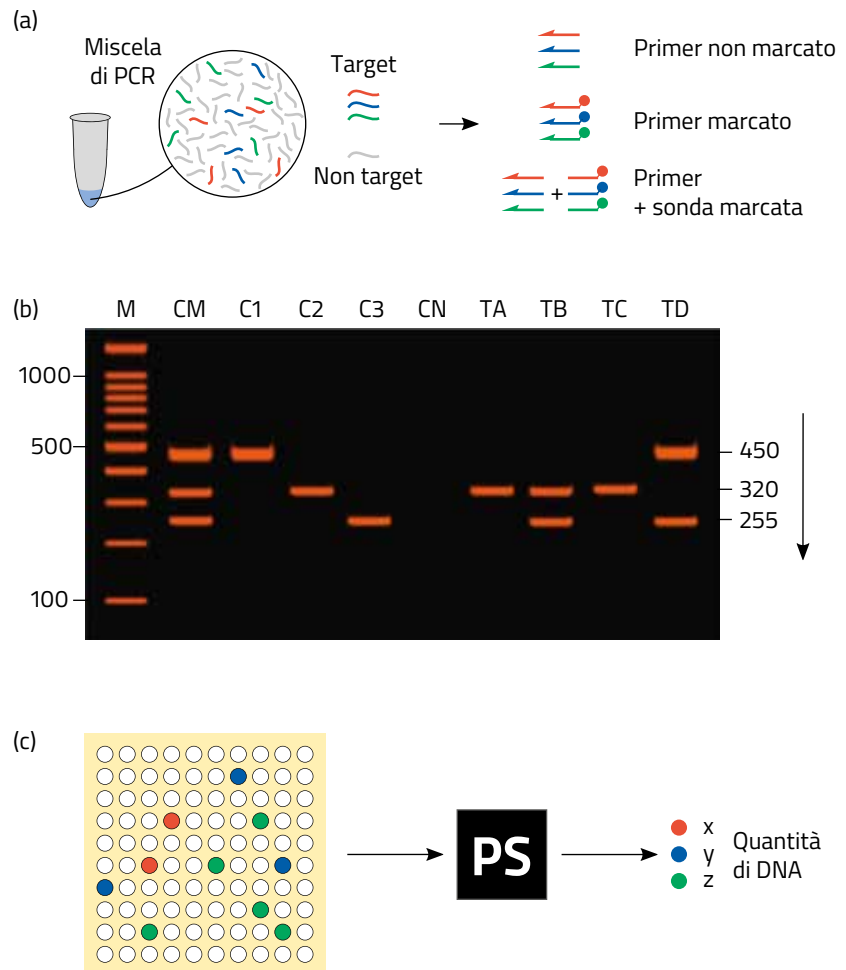


Figura 9.1 Basi della reazione a catena della polimerasi (PCR). (a) Il DNA duplex è denaturato mediante riscaldamento a 95 °C per ottenere filamenti singoli. (b) La temperatura viene abbassata a 55 °C e due primer oligonucleotidici sono appaiati alle loro sequenze complementari sul DNA target. Si noti che la temperatura ottimale di appaiamento dei primer sarà stata determinata mediante calcolo della T_m e conferma sperimentale. (c) La Taq polimerasi (termostabile) sintetizza dagli stampi i filamenti complementari per estensione dei primer a 72 °C. Viene quindi ripetuto il ciclo di denaturazione/appaiamento dei primer/copia (freccie blu). I numeri blu nei cerchi gialli mostrano i cicli (4 in questo schema). I numeri in grassetto blu indicano il numero di copie del duplex target alla fine di ogni ciclo. All'inizio, è presente una copia (1c) del duplex target. Alla fine del primo ciclo, ci sono due copie (2c), poi quattro (4c) ecc. Di solito vengono completati circa 30 cicli per una tipica reazione di PCR. In teoria, il numero di frammenti aumenta come 2^n , dove n è il numero di cicli. Pertanto, una PCR a 30 cicli genererà circa 10^9 copie di un singolo frammento target.

Figura 9.9 PCR multiplex. L'analisi di frammenti multipli può essere fatta con PCR standard, qPCR e dPCR. In (a), il campione di PCR contiene frammenti non target e tre target di interesse, che possono provenire da diverse fonti. La tecnica è flessibile e può rilevare, per esempio, agenti patogeni diversi in campioni clinici, specie diverse in campioni ambientali o geni diversi nello stesso campione. Le coppie di primer possono essere non marcate se l'elettroforesi qualitativa standard è il metodo di rilevamento, o possono essere marcate con fluorofori direttamente o in combinazione con una sonda. (b) L'elettroforesi su gel di agarosio può essere utilizzata per determinare i frammenti multipli se sono di dimensioni diverse. L'esempio mostra l'identificazione di tre agenti patogeni, con coppie di primer che generano ampliconi target di 450, 320 e 255 bp di lunghezza per gli agenti patogeni 1, 2 e 3, rispettivamente. Le corsie sono: M = marcatore di peso molecolare da 100 bp; CM = controllo multiplex positivo con DNA di tutti e tre i patogeni; C1, C2 e C3 = controlli positivi per ciascun patogeno separatamente; CN = controllo negativo (senza DNA). Le corsie TA-TD sono quattro campioni di test sconosciuti. La freccia mostra la direzione di movimento dei frammenti nel gel. I risultati indicano che i campioni TA e TC contengono DNA dell'agente patogeno 2, TB degli agenti patogeni 2 e 3 e TD degli agenti patogeni 1 e 3. (c) Per la cdPCR multiplex, le marcature con fluoroforo identificano i pozzetti (o le gocce se ddPCR) che contengono i frammenti target. Un processore di segnale (PS) viene utilizzato per analizzare e interpretare l'output e calcolare la quantità di ciascuno dei frammenti di DNA target presenti nel campione.



denaturazione, legame del primer ed estensione, ognuno dei quali raddoppia il numero di copie del frammento target. L'automazione del processo utilizzando un *termociclatore* e la disponibilità di *DNA polimerasi termostabili* hanno permesso alla tecnica di affermarsi diffusamente. La reazione di PCR standard procede per un numero di cicli (30 circa) e i prodotti sono quindi analizzati; per questo motivo, viene spesso chiamata *end-point PCR*.

I *primer* oligonucleotidici sono gli elementi discriminanti critici nella PCR, in quanto specificano i frammenti di DNA da amplificare. La progettazione dei primer viene ora eseguita più spesso mediante calcolo informatico utilizzando le informazioni delle banche dati di sequenza.

Essendoci circa 50 diverse varianti della PCR di base, ne abbiamo potute esaminare solo alcune. L'*RT-PCR* consente di amplificare l'mRNA generando cDNA prima della PCR. La PCR *annidata* e quella *inversa* sono due metodi concettualmente eleganti che illustrano come un'attenta progettazione possa estendere la specificità della procedura. I metodi di *PCR quantitativa e digitale* consentono una determinazione accurata della quantità di acido nucleico in un campione, con le ultime versioni della PCR digitale che portano la procedura in aree tecnologicamente avanzate, in modo simile allo sviluppo del sequenziamento del DNA di nuova generazione; per questo la dPCR viene talvolta definita *PCR di terza generazione*.

La Tabella 9.1 presenta un elenco degli acronimi e dei nomi delle diverse varianti di PCR; la PCR multiplex è stata l'ultima variante che abbiamo esaminato in dettaglio, ma nelle attività di ricerca sul web ti incoraggiamo a cercare informazioni più dettagliate anche sulle altre varianti.

Le applicazioni della tecnologia della PCR sono molte e diverse, e nuove procedure vengono sviluppate regolarmente. A volte queste comportano lo sviluppo di una forma più sofisticata di tecnologia basata sulla PCR che ha un ampio potenziale di applicazione. Altre volte, una tecnica esistente può essere utilizzata in modo nuovo o per indagare il genoma di un organismo che non è stato studiato in dettaglio. Considereremo le applicazioni della PCR in modo più completo nella Parte 4 di questo libro.

Infine, i test **diagnostici** rappresentano un'importante applicazione della tecnologia PCR, che è diventata familiare al grande pubblico (in modo indesiderato) durante la pandemia di COVID-19. In quel periodo, la PCR è stata costantemente al centro dell'attenzione mediatica, essendo ampiamente utilizzata in tutto il mondo per il rilevamento del virus SARS-CoV-2. Il pubblico ha così avuto modo di confrontarsi con alcune delle incertezze della scienza, emerse nei dibattiti sui test PCR, riflettendo questioni già discusse nei Paragrafi 1.4 e 3.2. Negli anni a venire, guardando indietro al periodo 2020–2022, forse diremo che questo è stato il momento in cui la sigla di tre lettere più nota in biologia è passata da “DNA” a “PCR”.

Parole chiave

Reazione a catena della polimerasi (PCR), Kary Mullis, oligonucleotidi, stampi di DNA, DNA polimerasi, Joshua Lederberg, end-point PCR, primer, DNA polimerasi termostabili, termociclatore, controllo positivo, controllo negativo, sequenza (del primer), inosina, basate sull'informatica, lunghezza (del primer), temperatura di fusione (T_m), sequenza unica, termofilo, *Thermus aquaticus*, *Taq* polimerasi, processività, fedeltà, emivita (dell'enzima), *Thermus flavus*, *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus furiosus*, ipertermofilo, hot-start PCR, RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*), RT-PCR competitiva, *nested PCR*, primer esterni, primer interni o annidati, IPCR (*Inverse PCR*), PCR quantitativa (qPCR), real-time qPCR, ciclo di quantificazione (Cq), ciclo soglia (Ct), curva di calibrazione, assoluta, relativa, PCR digitale (dPCR), PCR a diluizione limitante, cdPCR (*chamber digital PCR*), ddPCR (*droplet digital PCR*), distribuzione di Poisson, RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR*), AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), PCR multiplex, singleplex, ampliconi, PCR di terza generazione, test diagnostici.

Attività di ricerca sul web

Persone

Menziona la PCR e la maggior parte di coloro che ne sanno qualcosa riconoscerà *Kary Mullis* come la persona che ha inventato il processo. Approfondisci i dettagli di come Mullis ha sviluppato la PCR e dai uno sguardo più ampio ad alcune delle idee e delle controversie associate all'uomo che ha cambiato il modo in cui si è sviluppata la moderna biologia molecolare.

Luoghi

Facciamo due piccole deviazioni: il primo posto che visitiamo è il web. Analizzando la Tabella 9.1, considera alcuni dei termini elencati che non sono stati trattati nel testo. Utilizza termini di ricerca basati sul descrittore o sull'abbreviazione per

la variante di PCR. Prova a costruire un quadro di come il processo di PCR di base è stato modificato per sviluppare il nuovo metodo. La seconda deviazione ci porta sulla Highway 128 nel nord della California, dove si dirama dalla Highway 101. Utilizzando la funzione di street view della nota applicazione di mappatura, mettiti sulla Highway 128 in direzione nord da Cloverdale. Da qualche parte lungo questa strada, mentre si avvicina alla Anderson Valley, i fondamenti della PCR furono messi insieme da Kary Mullis, una notte di aprile del 1983. È solo una normale strada, che è stata il sito di una scoperta straordinaria.

Procedure della ricerca

Da un punto di vista teorico, la PCR è un processo elegante e concettualmente semplice. Nella pratica, come molti protocolli nella ricerca biologica, il metodo è un po' meno facile. Approfondisci due aspetti della PCR che hanno bisogno di un po' di ragionamento per essere compresi appieno: puoi procurarti alcuni fogli di carta per ragionare facendo degli schemi. In primo luogo, sebbene la PCR amplifichi un frammento definito, i primi cicli generano prodotti un po' irregolari in termini di lunghezza del frammento. Perché? In secondo luogo, quando calcoliamo "quanti frammenti dopo quanti cicli", di solito ci riferiamo all'amplificazione di un singolo frammento target. Perché è probabile che questo non sia il caso nella maggior parte delle applicazioni, che differenza farebbe per il risultato, ed è probabile che sia un problema? Buona fortuna!

Riflessioni

Quali argomenti hai trovato più impegnativi in questo capitolo? Cerca risorse che aiutino a chiarire i punti chiave.

Lecture per approfondire

Kralik, P. and Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front. Microbiol.*, 8, 108. URL [www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00108/full]. DOI [doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108].

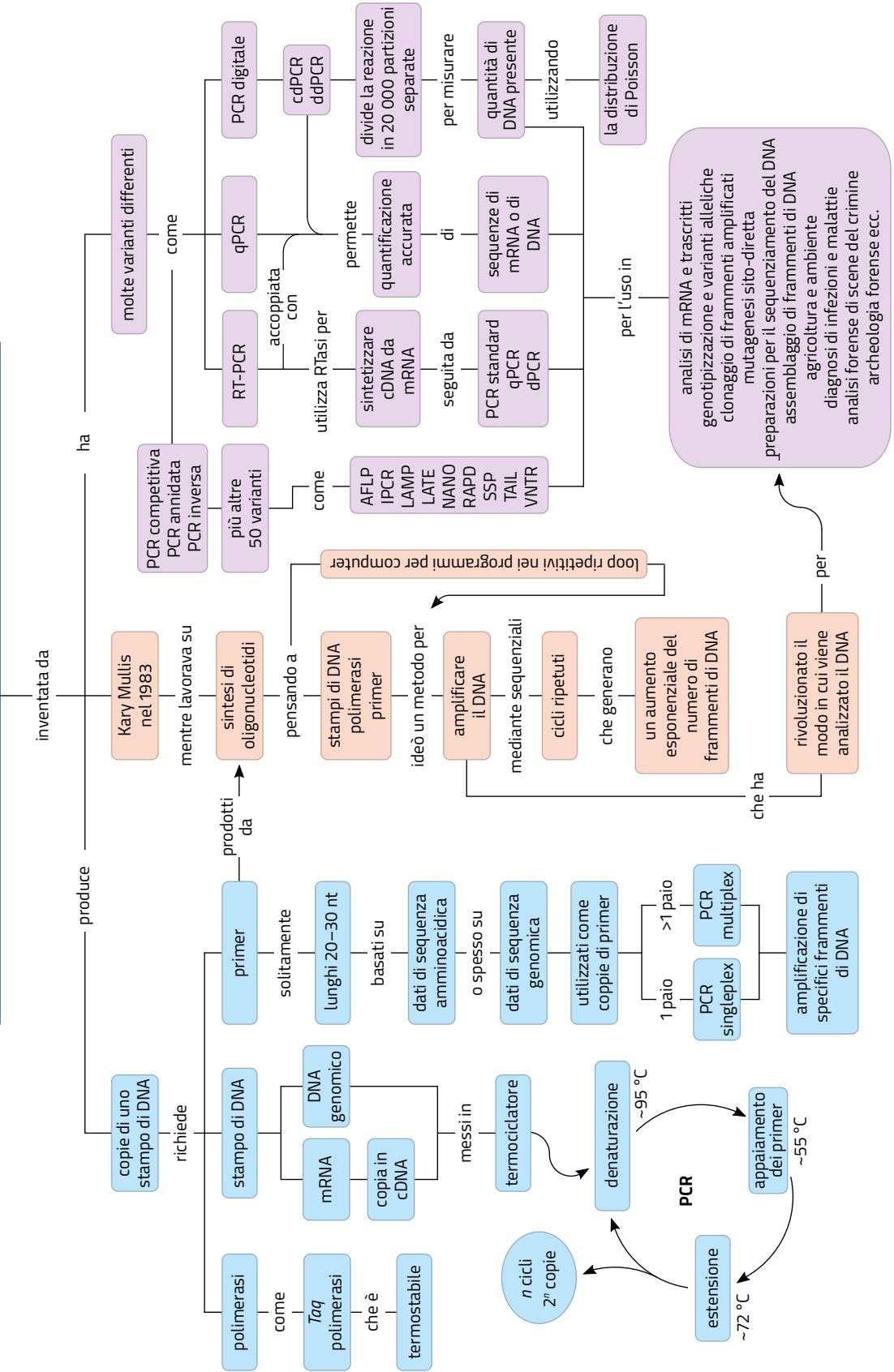
Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, 262 (4), 56-65. DOI [doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56].

Taylor, S. C. et al. (2017). Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci. Rep.*, 7, 2409. URL [www.nature.com/articles/s41598-017-02217-x#citeas]. DOI [doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x].

Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39 (1), 75-85. URL [www.future-science.com/doi/epub/10.2144/05391RV01]. DOI [doi.org/10.2144/05391RV01].

Xie, N. G. et al. (2022). Designing highly multiplex PCR primer sets with Simulated Annealing Design using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE). *Nat. Commun.*, 13, 1881. URL [www.nature.com/articles/s41467-022-29500-4#article-info]. DOI [doi.org/10.1038/s41467-022-29500-4].

Reazione a catena della polimerasi



Desmond S.T. Nicholl

Ingegneria genetica

A cura di Paolo Laveder e Cristiano De Pittà



Inquadra e scopri
i contenuti

Ingegneria genetica è un'introduzione tecnica di base ai principi fondamentali delle tecnologie del DNA. Trasmette le conoscenze necessarie a comprendere gli strumenti della biologia molecolare in modo accessibile, conciso e ad ampio spettro, così da inquadrare subito l'uso delle tecnologie del DNA anche in un sistema di riferimento etico.

Il libro è organizzato in quattro parti:

- *L'ingegneria genetica nel contesto* (capitoli 1-3) introduce i concetti di base e affronta le questioni etiche legate alle tecnologie del DNA;
- *Le basi dell'ingegneria genetica* (capitoli 4-6) contiene un'introduzione alla biologia molecolare e presenta gli strumenti con cui si opera a livello molecolare;
- *I metodi di manipolazione genica* (capitoli 7-12) approfondisce gli strumenti per modificare il DNA, proponendo gli esperimenti e le procedure di uso comune e quelle più innovative;
- *L'ingegneria genetica in azione* (capitoli 13-17) analizza l'impatto delle tecnologie del DNA in diversi ambiti, quali le applicazioni mediche, forensi, agrarie, veterinarie e ha un intero capitolo dedicato alla clonazione.

È un'opera che spiega in modo efficace il funzionamento delle tecniche di base e al tempo stesso stimola la curiosità e la voglia di approfondire, anche grazie alle rubriche di supporto allo studio e per l'approfondimento.

Ogni capitolo si apre con l'elenco degli *Obiettivi di apprendimento* ed è scandito da piccoli box disposti a fianco del testo, nei quali sono sintetizzati i concetti chiave che via via emergono. Una ricca proposta di spunti di lavoro si trova al termine del capitolo, quando sono state poste le basi per farne buon uso: un elenco di *Parole chiave*, che raccoglie i termini più importanti da conoscere; una sezione di *Attività di ricerca sul web*, con esercizi di esplorazioni online incentrati su *Persone*, *Luoghi*, *Procedure della ricerca* e *Riflessioni* sui contenuti; una selezione di *Letture per approfondire*; e infine una *Mappa concettuale*, a tutta pagina, che mostra le connessioni tra i principali argomenti e aiuta a ripassare in modo efficace tutti i contenuti trattati. Un *Glossario* in fondo al volume riporta le definizioni dei termini essenziali.

Nel sito del libro sono disponibili video sulle tecniche di laboratorio, test interattivi per l'autovalutazione e flashcard per il ripasso, accessibili anche attraverso lo smartphone con l'app **laZ Guarda!**

Desmond S.T. Nicholl è stato professore di Scienze biologiche, responsabile per le Bioscienze e per il Miglioramento della qualità e prorettore per la Didattica presso la University of the West of Scotland. È autore anche di *Cell and Molecular Biology* (Learning & Teaching Scotland, 2000).

Le risorse digitali

universita.zanichelli.it/nicholl

A questo indirizzo sono disponibili le risorse digitali di complemento al libro.

Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su **my.zanichelli.it** inserendo il codice di attivazione personale contenuto nel libro.

Libro con Ebook

Chi acquista il libro nuovo può accedere gratuitamente all'Ebook, seguendo le istruzioni presenti nel sito.

L'accesso all'Ebook e alle risorse digitali protette è personale, non condivisibile e non cedibile, né autonomamente né con la cessione del libro cartaceo.

NICHOLL*INGEGNERIA GENETICA LUM

ISBN 978-88-08-39931-1



9 788808 399311

7 8 9 0 1 2 3 4 5 (60R)