

IL DNA RICOMBINANTE

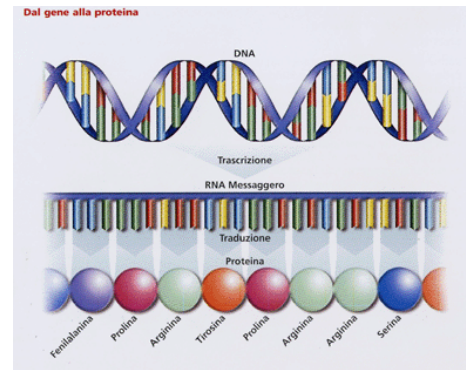
Molecola di DNA formata da segmenti di origine diversa

A COSA SERVE?

STUDIARE I GENI E MAPPARE IL DNA

STABILIRE LE BASI MOLECOLARI DELLE MALATTIE GENETICHE

PRODURRE PROTEINE SFRUTTANDO LE CAPACITA' DI SINTESI DEI MICRORGANISMI



COME SI OTTIENE?

TAGLIO DEL DNA PER OTTENERE LA SEQUENZA DESIDERATA

MOLTIPLICAZIONE DEL TRATTO DI DNA (METODO PCR)

SINTESI DI UN PLASMIDE

BANCHE GENOMICHE O LIBRERIE GENOMICHE

INSERIMENTO IN UN BATTERIO

INDIVIDUAZIONE DEL GENE TRAMITE L'ISOLAMENTO CON SONDA RADIOATTIVA O TECNICA DELL'IBRIDAZIONE

CONFRONTO FRA I VARI FRAMMENTI PER LA MAPPATURA DEL DNA TRAMITE ELETTROFORESI

FORMAZIONE DI CLONI BATTERICI E CONSEGUENTI COPIE MULTIPLE DI PLASMIDI

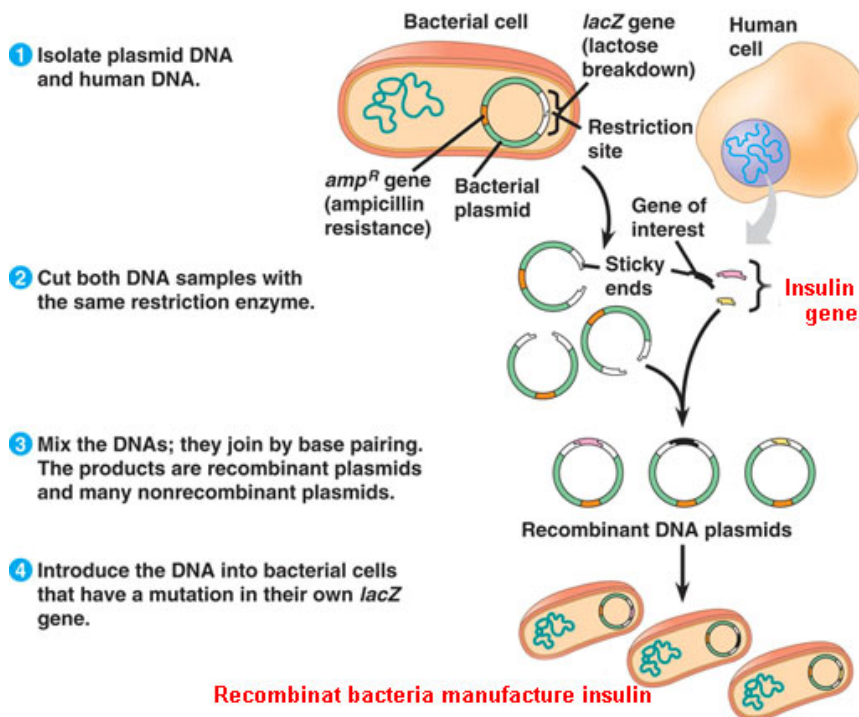
SINTESI DA PARTE DEL BATTERIO DELLA PROTEINA CODIFICATA DAL GENE INSERITO CON IL PLASMIDE

PRODUZIONE VACCINI

DIAGNOSI MALATTIE GENETICHE (RFLP) CON LA TECNICA DELL'IBRIDAZIONE

TERAPIA GENETICA CON L'INSERIMENTO DI UN GENE SANO

ORGANISMI TRANSGENICI



DESCRIZIONE DELLE FASI

1. TAGLIO DEL DNA TRAMITE GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

Il DNA può essere tagliato in punti precisi con SEQUENZE SIMMETRICHE es CTTAAG da ENZIMI DI RESTRIZIONE di origine batterica

servono ai batteri per tagliare parti estranee di DNA virale

i tagli possono essere PIATTI



o COESIVI



ogni enzima taglia in corrispondenza di una stessa sequenza generando segmenti di diversa lunghezza ma con UGUALE ESTREMITA' (con A, o con T, o con C o con G)

si ottengono gruppi di frammenti con uguale estremità per ogni enzima utilizzato

un solo frammento non è "leggibile" o non può essere sufficiente per una sintesi proteica

SI MOLTIPLICANO I FRAMMENTI

METODO PER CLONAGGIO BATTERICO

si realizza il VETTORE

si inserisce il frammento in un PLASMIDE o in VIRUS o in un TRASPOSONE con l'aiuto del DNA LIGASI

VETTORE = PLASMIDE +FRAMMENTO DI RESTRIZIONE

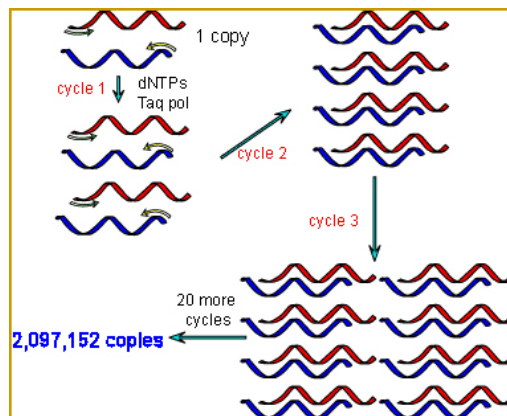
si inserisce il vettore in un BATTERIO (l'ingresso è spontaneo quando si mettono batteri a contatto con i vettori)

SI SELEZIONANO I BATTERI che hanno assunto il vettore avendo introdotto una COMPONENTE RADIOATTIVA o un GENE SELETTIVO (es. resistenza ad un antibiotico o enzima metabolico)

METODO PCR
METODO DELLA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI

si prepara la "PIASTRA"
FRAMMENTI + PRIMER + DNA POLIMERASI

1. si scalda a 90°C: il DNA si svolge e si separano i due filamenti
2. si raffredda a 50°C: i primer si attaccano ai filamenti riconoscendo l'estremità complementare
3. si scalda a 72°C: si ha la duplicazione
4. si raffredda a temperatura ambiente: il DNA si riavvolge
5. si ripete da 1 a 4 tante volte ottenendo TANTE COPIE DI CIASCUN FRAMMENTO



LIBRERIE GENOMICHE o BANCHE GENOMICHE
tanti gruppi di frammenti clonati ottenuti da una molecola di DNA

il metodo per clonaggio è più lento e meno sicuro

il metodo PCR è veloce ed efficiente

3ª FASE: RICOSTRUZIONE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE

A. ANALISI DEL DNA

Il DNA è in forma di frammenti che si possono ottenere da taglio di DNA con enzimi di restrizione m-RNA tramite la TRASCRITTASI INVERSA,

1. Si raccolgono campioni identici di una molecola di DNA trattati con differenti tipi di enzimi di restrizione e poi clonati (metodo PCR)
2. Ciascun gruppo di frammenti di DNA ottenuti con uno specifico enzima di restrizione vengono separati tramite elettroforesi in base alla diversa lunghezza
3. Si ricostruisce la sequenza riunendo tutti i risultati dell'individuazione di frammenti diversi di ciascun enzima come in un "puzzle"

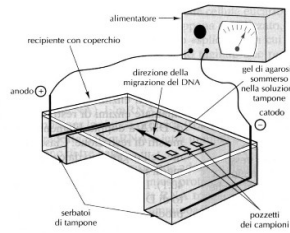
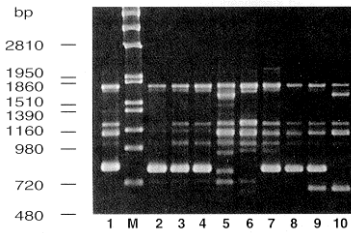


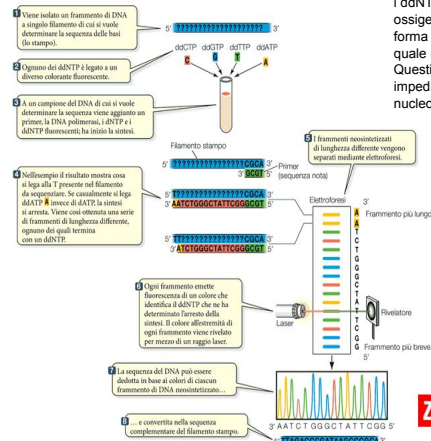
Figura 40.2 Elettroforesi su gel di agaroso del DNA.



METODO SANGER

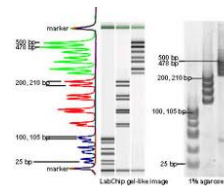
Come si fa a sequenziare il DNA?

GLI STRUMENTI DELLA RICERCA



il ddNTP sono nucleotidi privati di un ossigeno a livello di gruppo ossidrilico che forma il legame fosfodiesterico tramite il quale i nucleotidi si legano fra di loro. Questi ddNTP quindi, dove si inseriscono impediscono la crescita della catena nucleotidica

Sadava et al. *Biologia blu* © Zanichelli editore, 2012



B. LA LOCALIZZAZIONE DEI "LOCI"

1. Si costruisce la SONDA

Si marca radioattivamente o si colora con colorante fluorescente un breve segmento di DNA o RNA complementare alle sequenze nucleotidiche da ricercare

2. Si scalda il DNA in presenza delle sonde

Il DNA si separa nei due filamenti

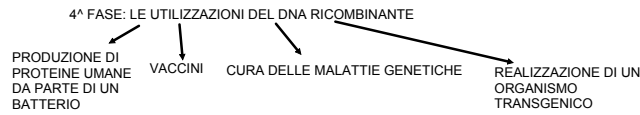
3. si raffredda

Il DNA si appaia con le sonde

4. si separano i segmenti di DNA ibridizzati con le sonde

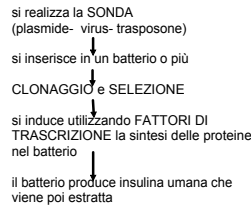
attraverso l'uso di strumenti che riconoscono la marcatura si distinguono e si separano i DNS ibridizzati da quelli normali

vengono utilizzati per individuare sequenze specifiche
 GENI MUTANTI
 es. metodo sulle SEQUENZE RFLP
 sequenze riconoscibili per diversi siti di restrizione in base a diverse zone di DNA satellite rispetto a quelle di un gene sano



PRODUZIONE DI PROTEINE UMANE: IL CASO DELL'INSULINA
(altri esempi SOMATOSTATINA - ORMONE SOMATOTROPO - ERITROPOIETINA)

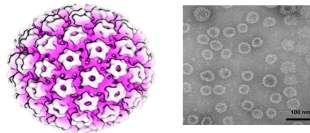
dall'm- RNA umano dell'insulina si ottiene un DNA PRIVO DI ISTONI tramite l'enzima TRASCRIPTASI INVERSA



VACCINI: si costruisce un DNA virale non virulento (che non è in grado di duplicarsi) con ANTIGENI che inducono la produzione di anticorpi nel soggetto "vaccinato"

Composizione vaccini HPV

particelle simil-virali ("Virus-like Particles", o VLP) + Aduvanti

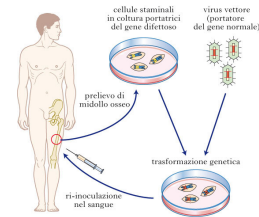


CURA DELLE MALATTIE GENETICHE: la sonda ha legato il DNA che contiene il GENE SANO

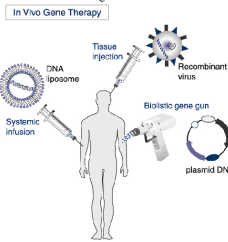
si incola nel soggetto malato
 ↓
 la sonda inserisce il gene sano nel DNA del soggetto
 ↓
 il gene sano funziona

es. CASO DELLA SCID (malattia causata dalla mancanza di recettori per la maturazione dei linfociti)

si inserisce il gene che entra in un punto casuale del genoma
 ↓
 2 bambini si ammalano di leucemia causa: l'inserimento casuale ha "sbloccato" il sistema di controllo della divisione cellulare



I virus, introdotti nell'organismo con aerosol e iniezioni, si diffondono lungo i vasi sanguigni. I ceppi di virus che retrotrascrivono il loro genoma ad RNA in DNA e lo integrano nel genoma della cellula infettata, sono impiegati nella terapia in vivo. I più usati sono i retrovirus, che tuttavia inseriscono il DNA solo nelle cellule in fase di mitosi, escludendo così le cellule che normalmente non si dividono, come i neuroni o le cellule epatiche. Benché gli adenovirus siano capaci di lavorare su cellule non in mitosi, la loro azione espone le cellule ad essere distrutte dal sistema immunitario. Inoltre, sembra che l'integrazione del DNA non sia definitiva. Entrato nella cellula, il DNA-ricombinante dei virus dà luogo alla trascrizione inversa.



ORGANISMO TRANSGENICO: si introduce in una cellula riproduttiva un gene estraneo che conferisce nuove caratteristiche all'organismo che si formerà

CLONAZIONE: caso PECORA DOLLY

Topi chimerici e transgenici

Per fare un organismo transgenico si deve arrivare a trasformare le cellule della linea germinale oppure il nucleo dello zigote. Nel topo in cui è problematico intervenire sugli uni e sull'altro è stato utilizzata la blastocisti su cui già veniva fatta sperimentazione. La facilità di uso dipende dal fatto che si riconosce più facilmente da uno zigote e si riesce a trovare facilmente nell'utero di una topolina accoppiata durante la notte. Dopo l'accoppiamento in poche ore si forma un tappo vaginale che è il segno dell'avvenuta fecondazione. La topolina da accoppiare viene trattata con estrogeni per far avvenire l'ovulazione e per aver un buon numero di blastocisti. I primi topi chimerici sono stati ottenuti iniettando direttamente il DNA nella blastocisti che lo riassorbe e con buona probabilità riesce a trasformare le cellule.

