

INDICE

Prefazione	1
-------------------	---

Parte I

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

3

Capitolo 1

L'importanza del clonaggio dei geni e dell'analisi del DNA

5

1.1	I primi sviluppi della genetica	5
1.2	L'introduzione del clonaggio e della reazione a catena della polimerasi (PCR)	6
1.3	Cosa si intende per clonaggio di un gene?	6
1.4	Cos'è la PCR?	8
1.5	Perché il clonaggio genico e la PCR sono importanti	9
1.5.1	Ottenere una preparazione pura di un gene attraverso il clonaggio	9
1.5.2	Anche la PCR può essere usata per isolare un gene	11
1.6	Come orientarsi in questo libro	13

<i>Bibliografia</i>	14
---------------------	----

Capitolo 2

I vettori per il clonaggio dei geni: plasmidi e batteriofagi

15

2.1	Plasmidi	15
2.1.1	Dimensione e numero di copie	17
2.1.2	Coniugazione e compatibilità	18
2.1.3	Classificazione dei plasmidi	18
2.1.4	Plasmidi in organismi diversi dai batteri	19
2.2	Batteriofagi	19
2.2.1	Il ciclo infettivo dei fagi	20
2.2.2	Fagi lisogeni	21
	I geni sul DNA del fago λ sono organizzati in gruppi	22
	Il DNA del fago λ può essere lineare o circolare	23
	M13, un fago filamentoso	24
2.2.3	Virus come vettori di clonaggio per altri organismi	26

<i>Bibliografia</i>	26
---------------------	----

Capitolo 3

La purificazione del DNA dalle cellule

27

3.1	Isolamento del DNA cellulare totale	27
3.1.1	Crescita e raccolta di una coltura di cellule batteriche	28

3.1.2	Preparazione di un estratto cellulare	30
3.1.3	Purificazione del DNA da un estratto cellulare	31
	Rimozione dei contaminanti tramite estrazione con solventi organici e digestione enzimatica	31
	Utilizzo della cromatografia a scambio ionico per la purificazione del DNA da estratti cellulari	32
	Utilizzo del silice per purificare il DNA da estratti cellulari	32
3.1.4	Concentrare il DNA	35
3.1.5	Misurare la concentrazione di DNA	35
3.1.6	Altri metodi di isolamento del DNA cellulare totale	36
3.2	Isolamento del DNA plasmidico	37
3.2.1	Separazione sulla base delle dimensioni	38
3.2.2	Separazione in base alla conformazione	39
	La denaturazione alcalina	39
	La centrifugazione in gradiente di densità con bromuro d'etidio e cesio cloruro	40
3.2.3	Amplificazione dei plasmidi	42
3.3	Isolamento del DNA fagico	42
3.3.1	Allestimento di colture per ottenere titoli elevati di fago λ	43
3.3.2	Preparazione di fagi λ non lisogeni	44
3.3.3	Raccolta dei fagi da una coltura di cellule infette	44
3.3.4	Purificazione del DNA dalle particelle di fago λ	45
3.3.5	La purificazione del DNA di M13 è meno problematica	46

<i>Bibliografia</i>	47
---------------------	----

Capitolo 4

La manipolazione del DNA purificato

48

4.1	Gli enzimi per la manipolazione del DNA	49
4.1.1	Le nucleasi	49
4.1.2	Le ligasi	51
4.1.3	Le polimerasi	51
4.1.4	Gli enzimi che modificano il DNA	53
4.2	Gli enzimi che tagliano il DNA: le endonucleasi di restrizione	53
4.2.1	La scoperta e la funzione delle endonucleasi di restrizione	54
4.2.2	Le endonucleasi di restrizione di tipo II tagliano il DNA in corrispondenza di sequenze nucleotidiche specifiche	55
4.2.3	Estremità piatte ed estremità coesive	56
4.2.4	Determinazione della frequenza delle sequenze bersaglio in una molecola di DNA	57
4.2.5	Eseguire una digestione con enzimi di restrizione in laboratorio	58

4.2.6	Analisi dei risultati della reazione di taglio da parte di un'endonucleasi di restrizione	60
	Separazione delle molecole tramite elettroforesi su gel	60
	Visualizzazione delle molecole di DNA all'interno del gel di agarosio	60
4.2.7	Determinazione delle dimensioni delle molecole di DNA	62
4.2.8	Mappatura della posizione dei siti di restrizione lungo la molecola di DNA	62
4.2.9	Tecniche specializzate di elettroforesi su gel per la separazione di grandi molecole di DNA	65
4.3	La ligazione: unire insieme frammenti di DNA	67
4.3.1	Il meccanismo d'azione della DNA ligasi	67
4.3.2	Le estremità coesive aumentano l'efficienza della ligazione	67
4.3.3	Come dotare di estremità coesive una molecola di DNA con estremità piatte	68
	Linker	68
	Adattatori	69
	Code omopolimeriche	72
4.3.4	Ligazione di estremità piatte con la DNA topoisomerasi	73
	<i>Bibliografia</i>	75
Capitolo 5		
L'introduzione di DNA nelle cellule viventi		
5.1	La trasformazione: la captazione del DNA da parte delle cellule batteriche	78
5.1.1	Le specie batteriche hanno efficienze differenti nell'incorporare DNA esogeno	78
5.1.2	Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	78
5.1.3	Selezione delle cellule trasformate	79
5.2	L'identificazione dei ricombinanti	81
5.2.1	La selezione dei ricombinanti per pBR322 avviene tramite inattivazione inserzionale di un gene di resistenza agli antibiotici	81
5.2.2	L'inattivazione inserzionale non sempre riguarda la resistenza a un antibiotico	83
5.3	L'introduzione di DNA fagico nelle cellule batteriche	85
5.3.1	La trasfezione	85
5.3.2	L'impacchettamento <i>in vitro</i> di vettori di clonaggio basati sul fago λ	85
5.3.3	L'infezione da parte dei fagi causa la formazione di placche in terreno agar	85
5.4	L'identificazione dei fagi ricombinanti	87
5.4.1	Inattivazione inserzionale del gene <i>lacZ'</i> portato da un vettore fagico	87
5.4.2	Inattivazione inserzionale del gene <i>cl</i> di λ	87
5.4.3	Selezione tramite fenotipo Spi	88
5.4.4	Selezione sulla base delle dimensioni del genoma di λ	89
5.5	L'introduzione di DNA nelle cellule non batteriche	89
5.5.1	Trasformazione di singole cellule	89
5.5.2	Trasformazione di interi organismi	91
	<i>Bibliografia</i>	91
Capitolo 6		
I vettori di clonaggio per <i>Escherichia coli</i>		
6.1	Vettori derivati da plasmidi di <i>E. coli</i>	92
6.1.1	Nomenclatura dei vettori di clonaggio plasmidici	93
6.1.2	pBR322 possiede proprietà utili	93
6.1.3	Il pedigree di pBR322	94
6.1.4	Vettori plasmidici avanzati per <i>E. coli</i>	94
	pUC8: vettore con selezione per il fenotipo Lac	95
	pGEM3Z: vettore per la trascrizione <i>in vitro</i> del DNA clonato	97
6.2	Vettori derivati dal fago λ	98
6.2.1	Segmenti del genoma di λ possono essere deleti senza compromettere la funzionalità del fago	98
6.2.2	Isolamento di fagi λ modificati privi di specifici siti di restrizione tramite selezione naturale	99
6.2.3	Vettori di inserzione e di sostituzione	100
	Vettori di inserzione	101
	Vettori di sostituzione	101
6.2.4	Il clonaggio con vettori λ di inserzione e di sostituzione	102
6.2.5	Lunghi frammenti di DNA possono essere clonati nei cosmidi	103
6.2.6	I vettori λ e altri vettori a elevata capacità permettono la costruzione di librerie genomiche	104
6.3	Vettori per la produzione di DNA a singola elica	105
6.3.1	Vettori basati sul batteriofago M13	105
6.3.2	Vettori ibridi plasmide-M13	106
6.4	Vettori per altri batteri	108
	<i>Bibliografia</i>	109
Capitolo 7		
I vettori di clonaggio per le cellule eucariotiche		
7.1	Vettori per lieviti e altri funghi	110
7.1.1	Marcatori di selezione per il plasmide 2 μm	111
7.1.2	Vettori derivati dal plasmide 2 μm: i plasmidi episomici di lievito	112
7.1.3	Il plasmide YEp può integrarsi nel DNA cromosomico di lievito	112
7.1.4	Altri tipi di vettori per il clonaggio in lievito	112
7.1.5	I cromosomi artificiali possono essere utilizzati per clonare lunghi frammenti di DNA in lievito	115
	La struttura e l'utilizzo di un vettore YAC	115
	Applicazioni dei vettori YAC	117
7.1.6	Vettori per altri lieviti e funghi	117
7.2	Vettori per le piante superiori	117

7.2.1	Agrobacterium tumefaciens, il più piccolo ingegnere genetico naturale	118			
	Utilizzo del plasmide Ti per introdurre geni esogeni in una cellula vegetale	118			
	Produzione di piante trasformate con il plasmide Ti	121			
	Il plasmide Ri	122			
	Limitazioni del clonaggio con i plasmidi di <i>Agrobacterium</i>	122			
7.2.2	Il clonaggio di geni in piante per trasferimento genico diretto	123			
	Trasferimento genico diretto nel nucleo	123			
	Inserimento di geni nel genoma dei cloroplasti	125			
7.2.3	Tentativi di utilizzare i virus delle piante come vettori di clonaggio	125			
	Vettori basati sui caulimovirus	125			
	Vettori basati sui geminivirus	126			
7.3	Vettori per gli animali	127			
7.3.1	Vettori di clonaggio per gli insetti	127			
	Gli elementi P come vettori di clonaggio per <i>Drosophila</i>	127			
	Vettori di clonaggio basati su virus degli insetti	128			
7.3.2	Il clonaggio nei mammiferi	129			
	Virus come vettori di clonaggio per le cellule di mammifero	129			
	Clonaggio di geni senza l'utilizzo di vettori	130			
	<i>Bibliografia</i>	131			
Capitolo 8					
L'isolamento del clone di un singolo gene					
8.1	Il problema della selezione	133			
8.1.1	Le due tecniche fondamentali per ottenere il clone di interesse	133			
8.2	La selezione diretta	135			
8.2.1	Il recupero della capacità di sopravvivenza indotto dal marcatore aumenta le applicazioni della selezione diretta	135			
8.2.2	Scopi e limiti della tecnica del recupero della sopravvivenza	137			
8.3	L'identificazione di un clone all'interno di una genoteca	138			
8.3.1	Librerie di geni	138			
	Non tutti i geni vengono espressi contemporaneamente	139			
	Gli mRNA possono essere clonati sotto forma di DNA complementare	139			
8.4	Metodi di identificazione di un clone	141			
8.4.1	I filamenti complementari di acido nucleico vanno incontro a ibridazione reciproca	141			
8.4.2	Analisi con sonda di ibridazione su colonie o placche	142			
	Marcatura con tracciante radioattivo	143			
	Marcatura non radioattiva	144			
8.4.3	Esempi pratici di utilizzo delle sonde di ibridazione	144			
	Sonde a elevata frequenza di ibridazione per analizzare una libreria di cDNA	145			
	Sonde oligonucleotidiche per geni i cui prodotti proteici sono stati caratterizzati	146			
	Le sonde eterologhe permettono l'identificazione di geni simili	149			
	L'ibridazione col metodo di Southern consente di identificare un frammento di restrizione specifico contenente il gene desiderato	150			
8.4.4	Metodi di identificazione basati sul rilevamento della presenza del prodotto di traduzione del gene clonato	151			
	I metodi di rilevazione immunologica richiedono la presenza di anticorpi	152			
	Utilizzo di anticorpi purificati per la rilevazione di una proteina in colonie ricombinanti	152			
	Il problema dell'espressione genica	153			
	<i>Bibliografia</i>	154			
Capitolo 9					
La reazione a catena della polimerasi (PCR)					
9.1	La PCR in breve	155			
9.2	La PCR in maggiore dettaglio	158			
9.2.1	Progettazione dei primer oligonucleotidici per un esperimento di PCR	158			
9.2.2	Determinazione della temperatura corretta da utilizzare	160			
9.3	Dopo la PCR: la caratterizzazione dei prodotti di amplificazione	162			
9.3.1	L'elettroforesi su gel dei prodotti di PCR	162			
9.3.2	Il clonaggio dei prodotti di PCR	164			
9.3.3	Il problema della frequenza di errore della polimerasi <i>Taq</i>	165			
9.4	La real-time PCR consente di quantificare il materiale di partenza	167			
9.4.1	Esecuzione di un esperimento di PCR quantitativa	167			
9.4.2	La real-time PCR consente di quantificare anche l'RNA	168			
	<i>Bibliografia</i>	170			
Parte II					
Il clonaggio dei geni e l'analisi del DNA nella ricerca scientifica					
					171
Capitolo 10					
Il sequenziamento dei geni e dei genomi					
10.1	Il sequenziamento tramite terminazione della catena di DNA	174			
10.1.1	Una visione d'insieme del sequenziamento a terminazione di catena	174			
10.1.2	Non tutte le DNA polimerasi possono essere utilizzate per il sequenziamento	176			
10.1.3	Sequenziamento a terminazione di catena con la DNA polimerasi <i>Taq</i>	177			

10.1.4	Limiti del sequenziamento a terminazione di catena	179
10.2	Le tecniche di sequenziamento di seconda generazione	180
10.2.1	Preparazione di una libreria per il sequenziamento di seconda generazione	181
	Frammentazione del DNA	181
	Immobilizzazione della libreria	182
	Amplificazione della libreria	183
10.2.2	Metodi di sequenziamento di seconda generazione	183
	Il sequenziamento per reversione della terminazione	184
	Il pirosequenziamento	185
10.2.3	Il sequenziamento di terza generazione	186
10.2.4	Sequenziamento di geni specifici con le tecniche di seconda generazione	187
10.3	Come si sequenzia un genoma	187
10.3.1	L'approccio shotgun per il sequenziamento dei genomi procariotici	189
	Sequenziamento shotgun del genoma di <i>Haemophilus influenzae</i>	189
	Sequenziamento shotgun del genoma di altri procarioti	191
10.3.2	Il sequenziamento dei genomi eucariotici	192
	Sequenziamento tramite shotgun gerarchico	193
	Sequenziamento shotgun di genomi eucariotici	195
	Cosa si intende per «sequenza genomica»?	197
	<i>Bibliografia</i>	197
Capitolo 11		
Lo studio dell'espressione e della funzione dei geni		
11.1	Studiare il trascritto di RNA di un gene	200
11.1.1	Come rilevare la presenza di un trascritto e ottenerne la sequenza nucleotidica	200
11.1.2	Mappatura dei trascritti tramite ibridazione tra un gene e il suo RNA	202
11.1.3	Analisi dei trascritti tramite allungamento di primer	204
11.1.4	Analisi dei trascritti tramite PCR	205
11.2	Studiare la regolazione dell'espressione genica	206
11.2.1	Identificare i siti di legame per proteine su una molecola di DNA	207
	Rallentamento su gel di complessi DNA-proteine	207
	Footprinting con DNasi I	208
	Saggio di interferenza per modificazione	209
11.2.2	Identificare le sequenze di regolazione tramite analisi di delezione	210
	Geni reporter	211
	Come si esegue un'analisi di delezione	213
11.3	Identificare e studiare il prodotto della traduzione di un gene clonato	214
11.3.1	Le tecniche HRT e HART consentono di identificare il prodotto di traduzione di un gene	214

11.3.2	Analisi delle proteine per mutagenesi <i>in vitro</i>	216
	Esistono tipi diversi di mutagenesi <i>in vitro</i>	217
	Introdurre una mutazione puntiforme in un gene clonato usando un oligonucleotide	217
	Altri metodi per generare una mutazione puntiforme in un gene clonato	219
	Potenziati applicazioni della mutagenesi <i>in vitro</i>	221

Bibliografia 222

Capitolo 12

Lo studio dei genomi

12.1 L'annotazione dei genomi

12.1.1 L'identificazione dei geni all'interno di una sequenza genomica

La ricerca delle fasi di lettura aperte 224

Le scansioni delle ORF sono poco efficaci nel localizzare i geni all'interno dei genomi eucariotici 225

La localizzazione dei geni è facilitata dalla ricerca di omologia 226

Comparazione tra sequenze di genomi correlati 227

Identificazione dei siti di legame per proteine regolatrici in una sequenza genomica 228

12.1.2 Determinare la funzione di un gene incognito

L'attribuzione della funzione di un gene tramite l'analisi sperimentale richiede un approccio inverso all'analisi genetica 229

Geni specifici possono essere inattivati per ricombinazione omologa 230

12.2 Lo studio del trascrittoma e del proteoma

12.2.1 Studiare il trascrittoma

Studiare il trascrittoma attraverso l'analisi su microarray o chip 232

Studiare il trascrittoma con la tecnica SAGE 233

Sequenziamento di un trascrittoma con la tecnologia RNA-seq 235

Vantaggi dei diversi metodi di analisi trascrittomica 236

12.2.2 Studiare il proteoma

Separazione delle proteine del proteoma 236

Identificazione delle singole proteine dopo la separazione 237

12.2.3 Studiare le interazioni proteina-proteina

Il phage display 239

Il sistema del doppio ibrido di lievito 240

Bibliografia 241

Parte III

Le applicazioni biotecnologiche del clonaggio e dell'analisi del DNA

Capitolo 13

La produzione di proteine da geni clonati

13.1 Vettori specifici per l'espressione di geni eterologhi in *E. coli*

247

13.1.1	Il promotore è un componente essenziale dei vettori di espressione	249
	Il promotore deve essere selezionato con cura	249
	Alcuni promotori comunemente utilizzati nei vettori di espressione	251
13.1.2	Cassette e geni di fusione	252
13.2	Problemi comuni nella produzione di proteine ricombinanti in <i>E. coli</i>	255
13.2.1	Problemi dovuti alla sequenza del gene esogeno	255
13.2.2	Problemi dovuti all'utilizzo di <i>E. coli</i> come ospite	257
13.3	La produzione di proteine ricombinanti nelle cellule eucariotiche	258
13.3.1	L'espressione di proteine ricombinanti in lieviti e funghi filamentosi	258
	Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> come ospite per l'espressione di proteine ricombinanti	258
	Altri lieviti e funghi	258
13.3.2	L'utilizzo di cellule animali per la produzione di proteine ricombinanti	259
	Produzione di proteine in cellule di mammifero	260
	Produzione di proteine in cellule di insetto	261
13.3.3	Il pharming: la produzione di proteine ricombinanti da animali e piante	262
	Pharming e animali	262
	Produzione di proteine ricombinanti in piante	263
	Considerazioni etiche relative al pharming	264
	<i>Bibliografia</i>	265
Capitolo 14		
Il clonaggio e l'analisi del DNA in medicina		
14.1	La produzione di principi farmaceutici con la tecnologia del DNA ricombinante	266
14.1.1	La produzione di insulina ricombinante	266
	Sintesi ed espressione di geni artificiali per l'insulina	268
14.1.2	La sintesi di ormoni della crescita umani in <i>E. coli</i>	268
14.1.3	La produzione di fattore VIII ricombinante	271
14.1.4	La sintesi di altre proteine ricombinanti umane	272
14.1.5	I vaccini ricombinanti	272
	Produzione di vaccini con proteine ricombinanti	273
	Vaccini ricombinanti da piante transgeniche	275
	Vaccini vivi ricombinanti	277
14.2	L'identificazione di geni responsabili di patologie umane	278
14.2.1	Come identificare il gene responsabile di una malattia genetica	280
	Localizzare la posizione approssimativa del gene all'interno del genoma umano	280
	Analisi di associazione per il gene umano <i>BRCA1</i>	281
	Identificazione dei candidati per il gene-malattia	283
14.3	La terapia genica	284
14.3.1	La terapia genica per le malattie ereditarie	284
14.3.2	Terapia genica e cancro	286
14.3.3	Aspetti etici della terapia genica	287
	<i>Bibliografia</i>	288
Capitolo 15		
Il clonaggio e l'analisi del DNA in agricoltura		
15.1	Il trasferimento genico per la manipolazione genetica delle piante	291
15.1.1	Piante che producono i propri pesticidi	291
	Le δ -endotossine di <i>Bacillus thuringiensis</i>	291
	Il clonaggio del gene della δ -endotossina nel mais	292
	Il clonaggio del gene della δ -endotossina nei cloroplasti	294
	Il problema della resistenza degli insetti alle coltivazioni esperimenti δ -endotossine	295
15.1.2	Coltivazioni resistenti agli erbicidi	297
	Le coltivazioni «Roundup Ready»	297
	Le coltivazioni resistenti al glifosato di nuova generazione	298
15.1.3	Altri programmi di trasferimento genico	299
15.2	La sottrazione genica	301
15.2.1	La tecnologia degli RNA antisenso per la modificazione della maturazione dei pomodori	301
	Utilizzo degli RNA antisenso per l'inattivazione del gene della poligalatturonasi	301
	Utilizzo degli RNA antisenso per l'inattivazione della sintesi di etilene	303
15.2.2	Altri esempi di utilizzo degli RNA antisenso nell'ingegneria genetica vegetale	304
15.3	Problemi associati all'uso di piante transgeniche	304
15.3.1	Preoccupazioni riguardo alla sicurezza dell'uso dei marcatori di selezione	304
15.3.2	La tecnica del terminatore	306
15.3.3	Possibili effetti dannosi sull'ambiente	306
	<i>Bibliografia</i>	308
Capitolo 16		
Il clonaggio e l'analisi del DNA nelle scienze forensi e in archeologia		
16.1	L'analisi del DNA per l'identificazione dei sospettati di un crimine	310
16.1.1	Determinazione dell'impronta genetica tramite ibridazione con sonda	311
16.1.2	Ottenimento del profilo di DNA con l'analisi tramite PCR delle corte ripetizioni in tandem	312
16.2	Lo studio delle parentele attraverso l'analisi dei profili di DNA	314
16.2.1	Individui imparentati hanno profili di DNA simili	314
16.2.2	L'analisi del profilo di DNA effettuata sulle spoglie della famiglia Romanov	314
	Analisi delle STR partendo dalle ossa dei Romanov	314

L'analisi del DNA mitocondriale è stata usata per collegare i resti dei Romanov ai loro discendenti viventi	316	L'analisi del DNA ha mostrato che i Neanderthal non sono gli antenati diretti degli europei moderni	321
Il caso dei figli mancanti	317	La sequenza del genoma dei Neanderthal suggerisce un incrocio genetico con <i>H. sapiens</i>	322
16.3 La determinazione del sesso tramite l'analisi del DNA	317	16.4.2 Il DNA può essere utilizzato anche per studiare le migrazioni dell'uomo preistorico	323
16.3.1 Analisi di PCR per sequenze specifiche del cromosoma Y	317	Gli uomini moderni potrebbero essere migrati dall'Etiopia alla penisola arabica	324
16.3.2 PCR per il gene della amelogenina	318	La colonizzazione del Nuovo Mondo	325
16.4 L'archeogenetica: utilizzare il DNA per studiare la preistoria dell'uomo	319	<i>Bibliografia</i>	327
16.4.1 Le origini dell'uomo moderno	320	Glossario	328
L'analisi del DNA ha messo in discussione l'ipotesi multiregionale	320	Indice analitico	340