

| | | |
|---|---|-----|
| 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

173

| | | |
|---------------|--|-----|
| 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 | 11.3.2 | Analisi delle proteine per mutagenesi <i>in vitro</i> | 216 |
| 10.2 | Le tecniche di sequenziamento di seconda generazione | 180 | | Esistono tipi diversi di mutagenesi <i>in vitro</i> | 217 |
| 10.2.1 | Preparazione di una libreria per il sequenziamento di seconda generazione | 181 | | Introdurre una mutazione puntiforme in un gene clonato usando un oligonucleotide | 217 |
| | Frammentazione del DNA | 181 | | Altri metodi per generare una mutazione puntiforme in un gene clonato | 219 |
| | Immobilizzazione della libreria | 182 | | Potenziali applicazioni della mutagenesi <i>in vitro</i> | 221 |
| | Amplificazione della libreria | 183 | | <i>Bibliografia</i> | 222 |
| 10.2.2 | Metodi di sequenziamento di seconda generazione | 183 | Capitolo 12 | | |
| | Il sequenziamento per reversione della terminazione | 184 | Lo studio dei genomi | 223 | |
| | Il pirosequenziamento | 185 | 12.1 L'annotazione dei genomi | 223 | |
| 10.2.3 | Il sequenziamento di terza generazione | 186 | 12.1.1 L'identificazione dei geni all'interno di una sequenza genomica | 224 | |
| 10.2.4 | Sequenziamento di geni specifici con le tecniche di seconda generazione | 187 | | La ricerca delle fasi di lettura aperte | 224 |
| 10.3 | Come si sequenzia un genoma | 187 | | Le scansioni delle ORF sono poco efficaci nel localizzare i geni all'interno dei genomi eucariotici | 225 |
| 10.3.1 | L'approccio shotgun per il sequenziamento dei genomi procariotici | 189 | | La localizzazione dei geni è facilitata dalla ricerca di omologia | 226 |
| | Sequenziamento shotgun del genoma di <i>Haemophilus influenzae</i> | 189 | | Comparazione tra sequenze di genomi correlati | 227 |
| | Sequenziamento shotgun del genoma di altri procarioti | 191 | 12.1.2 Determinare la funzione di un gene incognito | 229 | |
| 10.3.2 | Il sequenziamento dei genomi eucariotici | 192 | | L'attribuzione della funzione di un gene tramite l'analisi sperimentale richiede un approccio inverso all'analisi genetica | 229 |
| | Sequenziamento tramite shotgun gerarchico | 193 | | Geni specifici possono essere inattivati per ricombinazione omologa | 230 |
| | Sequenziamento shotgun di genomi eucariotici | 195 | 12.2 Lo studio del trascrittoma e del proteoma | 232 | |
| | Cosa si intende per «sequenza genomica»? | 197 | 12.2.1 Studiare il trascrittoma | 232 | |
| <i>Bibliografia</i> | | 197 | | Studiare il trascrittoma attraverso l'analisi su microarray o chip | 232 |
| Capitolo 11 | | | | Studiare il trascrittoma con la tecnica SAGE | 233 |
| Lo studio dell'espressione e della funzione dei geni | 199 | | | Sequenziamento di un trascrittoma con la tecnologia RNA-seq | 235 |
| 11.1 Studiare il trascritto di RNA di un gene | 200 | | | Vantaggi dei diversi metodi di analisi trascrittomica | 236 |
| 11.1.1 Come rilevare la presenza di un trascritto e ottenerne la sequenza nucleotidica | 200 | 12.2.2 Studiare il proteoma | 236 | Separazione delle proteine del proteoma | 236 |
| 11.1.2 Mappatura dei trascritti tramite ibridazione tra un gene e il suo RNA | 202 | | Identificazione delle singole proteine dopo la separazione | 237 | |
| 11.1.3 Analisi dei trascritti tramite allungamento di primer | 204 | 12.2.3 Studiare le interazioni proteina-proteina | 239 | Il phage display | 239 |
| 11.1.4 Analisi dei trascritti tramite PCR | 205 | | Il sistema del doppio ibrido di lievito | 240 | |
| 11.2 Studiare la regolazione dell'espressione genica | 206 | <i>Bibliografia</i> | | 241 | |
| 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 | | | | |

Parte III

Le applicazioni biotecnologiche del clonaggio e dell'analisi del DNA 243

Capitolo 13

La produzione di proteine da geni clonati 245

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

| | | | |
|---|-----|---|-----|
| 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 |