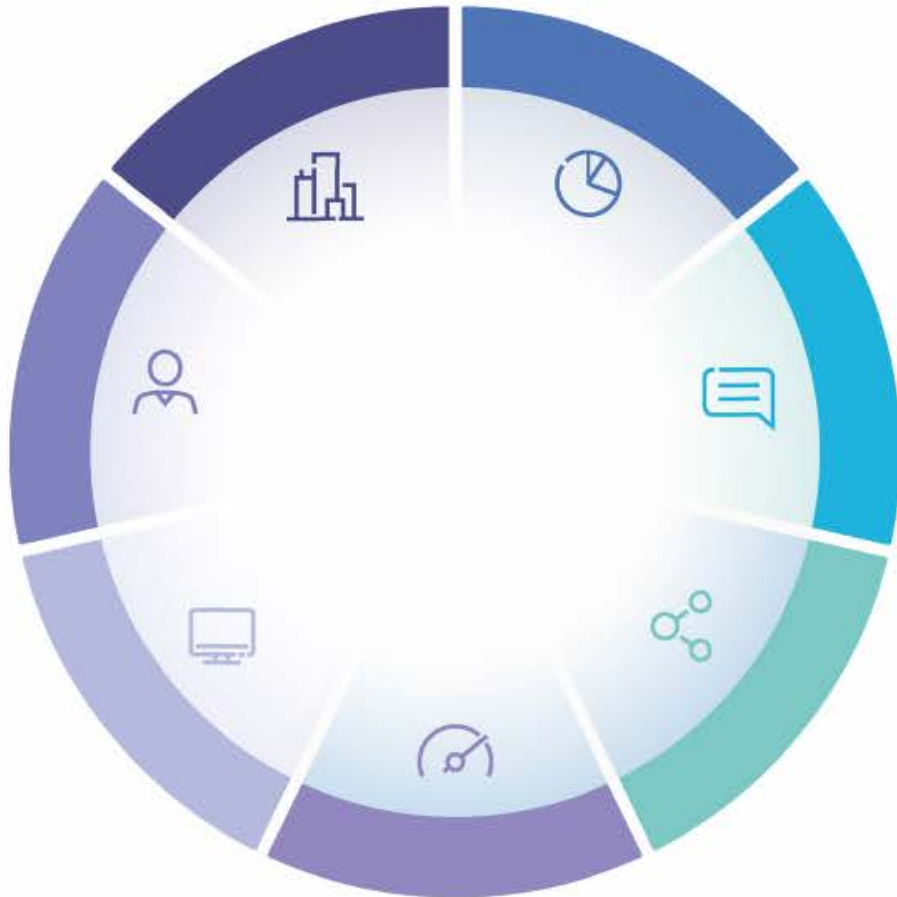


# Biotecnologie e DNA ricombinante

Presentazione a cura di Assunta Croce, PhD

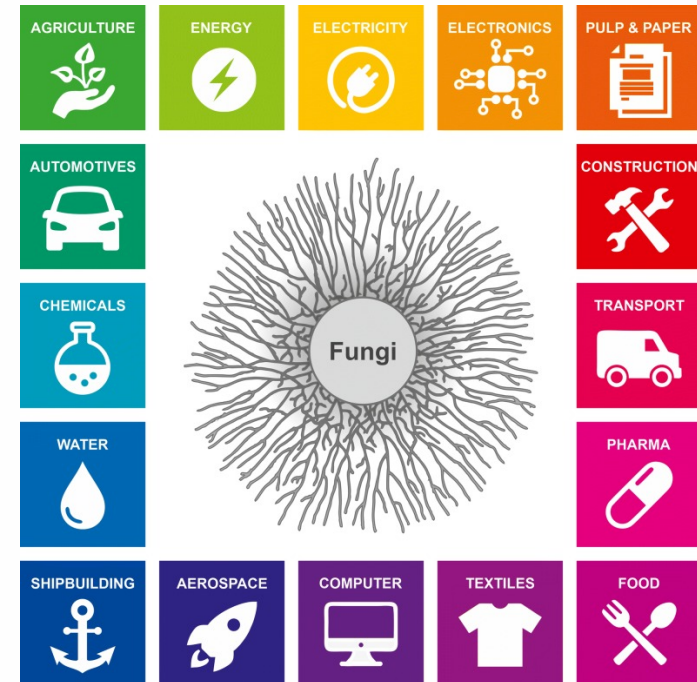


## Indice

1. CHE COSA SONO LE BIOTECNOLOGIE?
2. IL DNA RICOMBINANTE
  - ISOLAMENTO DEL DNA
  - I VETTORI PLASMIDICI
  - LA TRASFORMAZIONE BATTERICA
  - IDENTIFICAZIONE CLONI POSITIVI
3. APPLICAZIONI DEL DNA RICOMBINANTE

# Perché parlare di Biotecnologie?

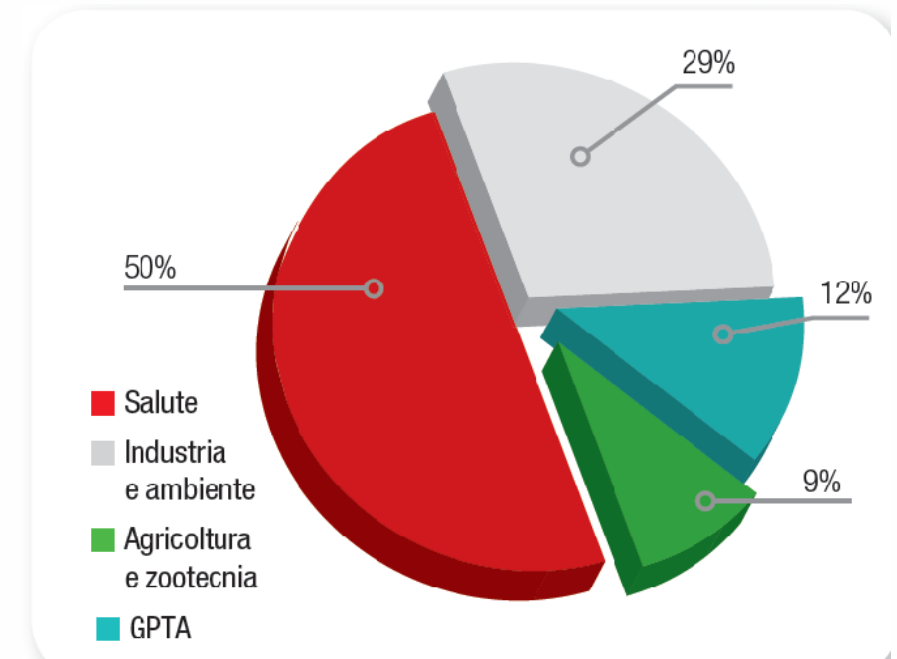
- **Intersezione** tra competenze e **aree scientifiche diverse**
- **Tema attuale** anche dal punto di vista della sostenibilità ambientale



Credit: Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper, 2020

# Perché parlare di Biotecnologie?

- Un **campo in rapido sviluppo** anche nel nostro Paese
- Negli ultimi 3 anni aumento del fatturato biotech del 16%, quasi due volte e mezza quella rilevata nel settore manifatturiero (7%)



Credit: ENEA - Servizio Industria e Associazioni Imprenditoriali - Centro Studi Assobiotec® - Maggio 2019

# Che cosa sono le Biotecnologie?

- **Biotecnologie** = Impiego di **organismi viventi** (vegetali, animali, batteri o virus) o **loro componenti** cellulari (o sub-cellulari) per ottenere un prodotto o un processo utile all'uomo.
- Area della biologia molto ampia
- Il termine è stato coniato nel 1917 da Karl Ereky, scienziato e ministro dell'agricoltura ungherese



# Biotechnologie tradizionali

- Impiego di microrganismi (batteri, lieviti, muffe) in processi fermentativi





# Biotecnologie tradizionali

- Incrocio e selezione di varietà più resistenti, produttive e più appetibili (zootecnia e agricoltura)



# Le Biotecnologie esistono da millenni

**BIOTECNOLOGIE  
TRADIZIONALI**

Utilizzano organismi  
selezionati sulla base  
di un fenotipo  
specifico

**BIOTECNOLOGIE  
INNOVATIVE**

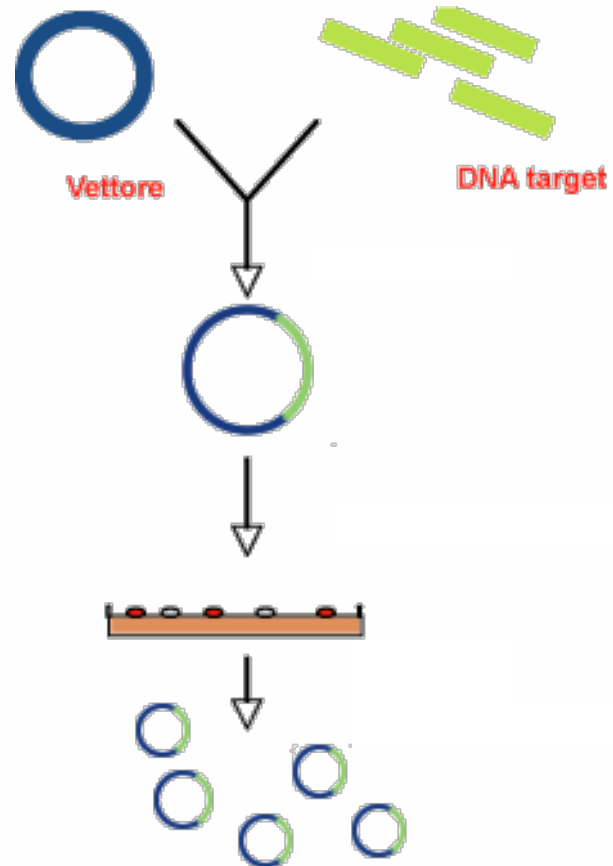
Impiegano organismi  
geneticamente  
modificati o parti di  
essi



# Organismi geneticamente modificati

- **Organismo** diverso da un essere umano, in cui il materiale genetico (**DNA**) è stato **modificato in un modo differente da quanto avviene in natura**, con l'accoppiamento e la ricombinazione genetica naturale.
- DNA modificato con le tecnologie del DNA ricombinante

# Tecnologia del DNA ricombinante



**Isolamento del DNA di interesse**

**Inserimento in un vettore**

**Trasferimento nelle cellule**

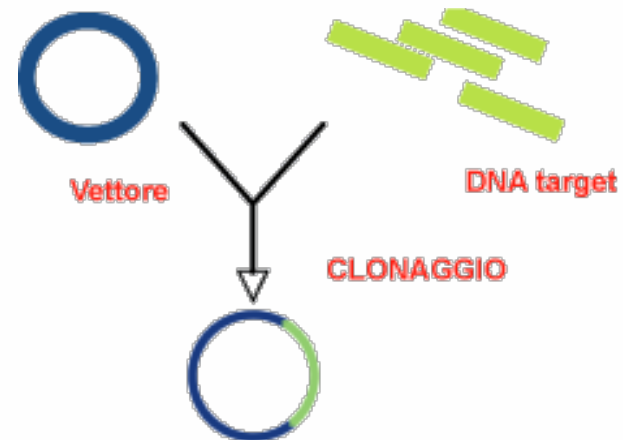
**Identificazione dei cloni positivi**

Modified from MITOpenCourse

# 1. Isolamento del DNA

# Enzimi che agiscono sul DNA

- Enzimi che tagliano il DNA (**nucleasi**)
- Enzimi che legano frammenti di DNA (**ligasi**)
- **Permettono di effettuare un'operazione di Taglia & Cuci**



# Diversi tipi di nucleasi

## ESONUCLEASI

Rimuovono nucleotidi partendo dalle estremità della molecola di DNA (single strand o double strand)

## ENDONUCLEASI

Tagliano dentro la molecola di DNA (single strand o double strand)

# Diversi tipi di nucleasi

## ESONUCLEASI

Rimuovono nucleotidi partendo dalle estremità della molecola di DNA (single strand o double strand)

## ENDONUCLEASI

Tagliano dentro la molecola di DNA (single strand o double strand)

Riconoscono sequenze specifiche

# Forbici molecolari

Gli **Enzimi di restrizione** sono **endonucleasi** che riconoscono una sequenza specifica di DNA e tagliano il DNA

- **Tipo 1:** tagliano anche a diverse kb di distanza dalla sequenza riconosciuta
- **Tipo 2** tagliano a valle della sequenza riconosciuta
- **Tipo 3:** tagliano dentro la sequenza riconosciuta

## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978



Photo from the Nobel Foundation archive.  
Werner Arber  
Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation archive.  
Daniel Nathans  
Prize share: 1/3



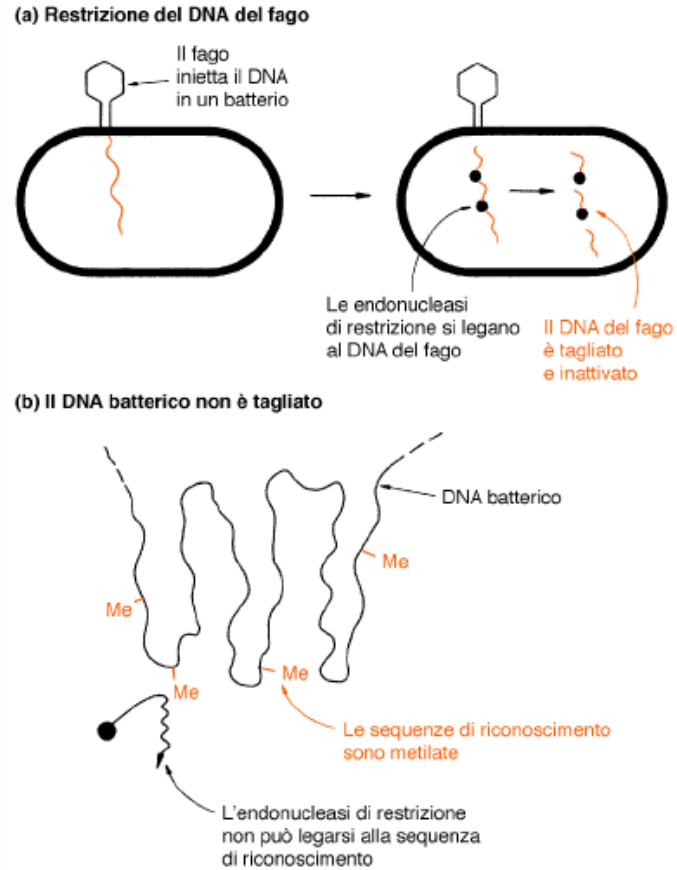
Photo from the Nobel Foundation archive.  
Hamilton O. Smith  
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978 was awarded jointly to Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton O. Smith "for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics."

Credit: [www.nobelprize.org/prizes/medicine/1978/summary](http://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1978/summary)



# La difesa dei batteri dai virus!



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978



Photo from the Nobel Foundation archive.

Werner Arber

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation archive.

Daniel Nathans

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation archive.

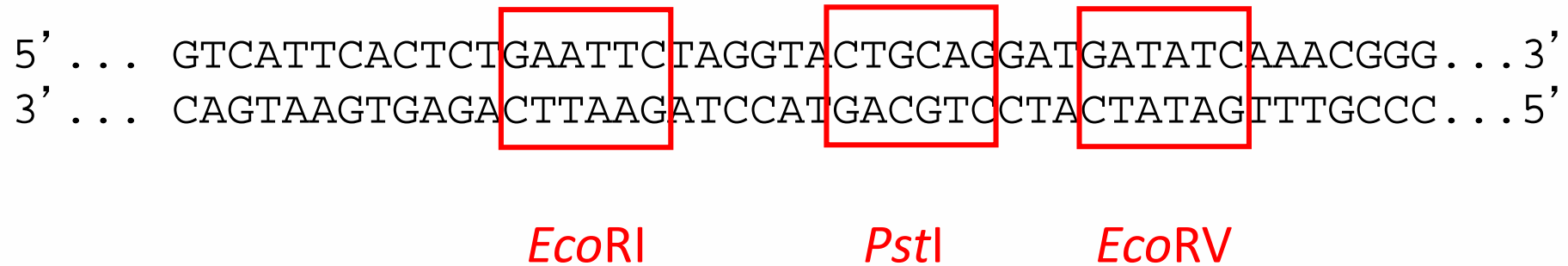
Hamilton O. Smith

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978 was awarded jointly to Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton O. Smith "for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics."

# Come funzionano le forbici molecolari?

- Ognuno riconosce una sequenza specifica (4-8 paia di basi)



- La sequenza è una palindroma, cioè può essere letta nello stesso modo in entrambe le direzioni

ERAN I MESI DI SEMINARE

# Specificità d'azione

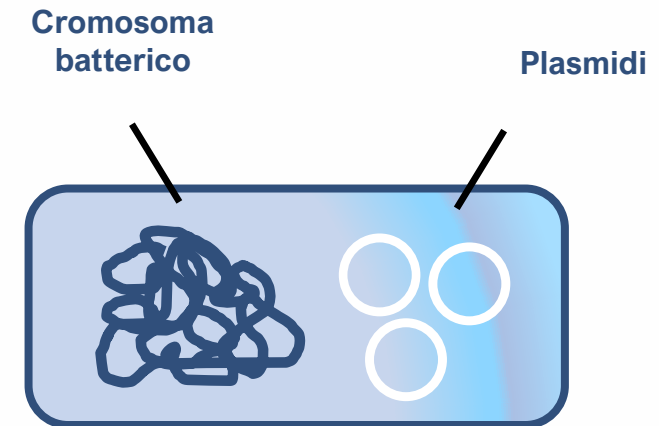
<i>Enzyme</i>	<i>Source</i>	<i>Recognition Site</i>	<i>Cut</i>
<b>EcoRI</b>	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<b>BamHI</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
<b>HindIII</b>	<i>Haemophilus influenza</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
<b>TaqI</b>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
<b>SmaI</b>	<i>Serratia marcescens</i>	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'
<b>HaeIII</b>	<i>Haemophilus egyptus</i>	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
<b>PstI</b>	<i>Providencia stuartii</i>	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
<b>SalI</b>	<i>Streptomyces albae</i>	5'GTCGAC 5'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'

- La **nomenclatura** deriva dal batterio in cui è stato isolato l'enzima
- Ogni enzima richiede **condizioni specifiche** di temperatura, pH, forza ionica
- Tagli più o meno frequenti nel genoma a seconda della lunghezza del sito di restrizione
- Per una lista completa consultare [International.neb.com](http://International.neb.com) o [Rebase.neb.com](http://Rebase.neb.com)

## 2. Inserimento del DNA in un vettore

# Plasmidi: via di accesso nelle cellule

- Molecole di DNA circolare a doppio filamento **extracromosomale**
- Replicazione **autonoma** rispetto al DNA batterico
- Possiedono geni che conferiscono un **vantaggio** al batterio che li possiede
- Numero di **copie variabile** (da 1 a circa 250 copie per cellula)
- Un batterio può possedere **più tipi di plasmidi**

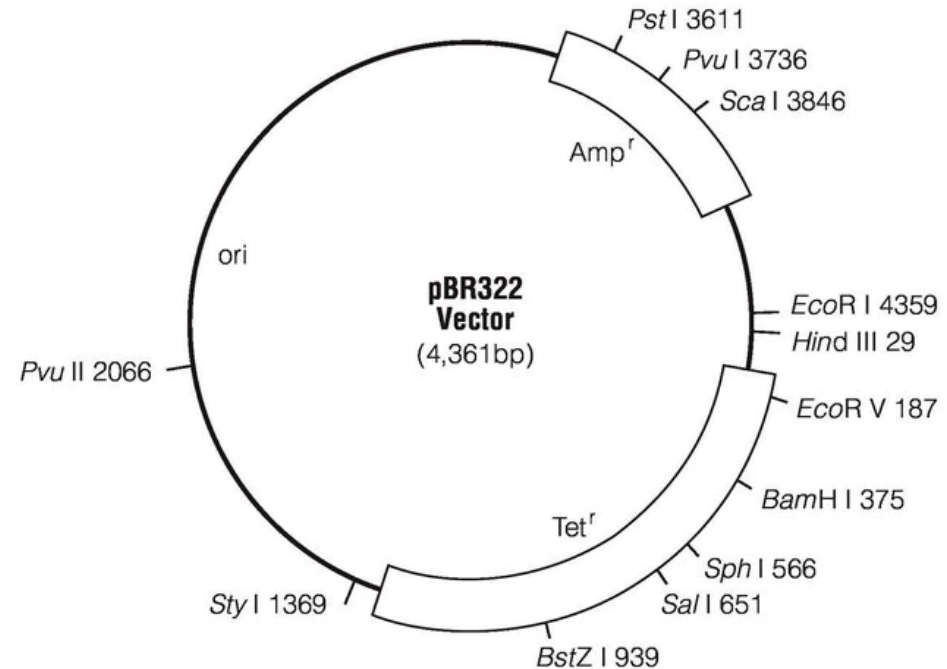


# Vantaggi specifici

1. **Resistenza ad antibiotici** (plasmide RP4 in *Pseudomonas aeruginosa*)
2. **Produzione di antibiotici** (plasmide SCP1 in *Streptomyces coelicolor*)
3. **Promozione della fertilità** (plasmide F di *E.coli*)
4. **Degradazione toluene** (plasmide TOL in *Pseudomonas putida*)
5. **Produzione di tossine per l'ospite** (insetticide in *Bacillus thuringiensis* o neurotossina in *Clostridium botulinum*)
6. **Produzione di tossine verso altri batteri** (plasmidi COL in *E.coli*)

# Uno dei primi plasmidi ingegnerizzati

1. Origine di replicazione
2. Resistenza alla Tetraciclina (gene tet)
3. Resistenza all'Ampicillina (gene bla)
4. Sequenze riconosciute da Enzimi di restrizione
5. Basso numero di copie (sequenze rop)

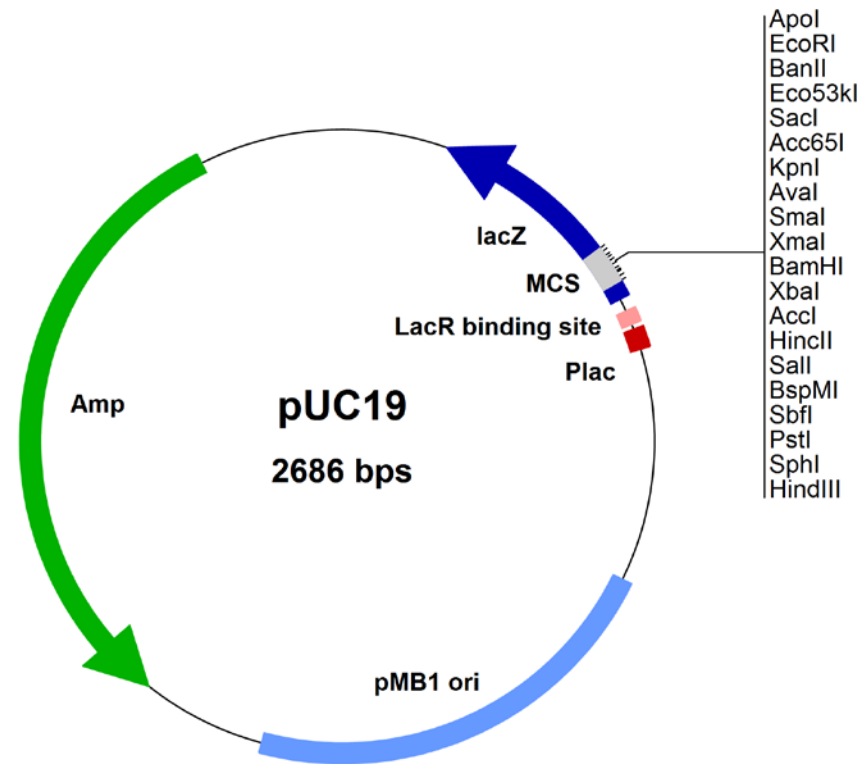


Credit: FisherScientific



# Esempio di plasmide - 1

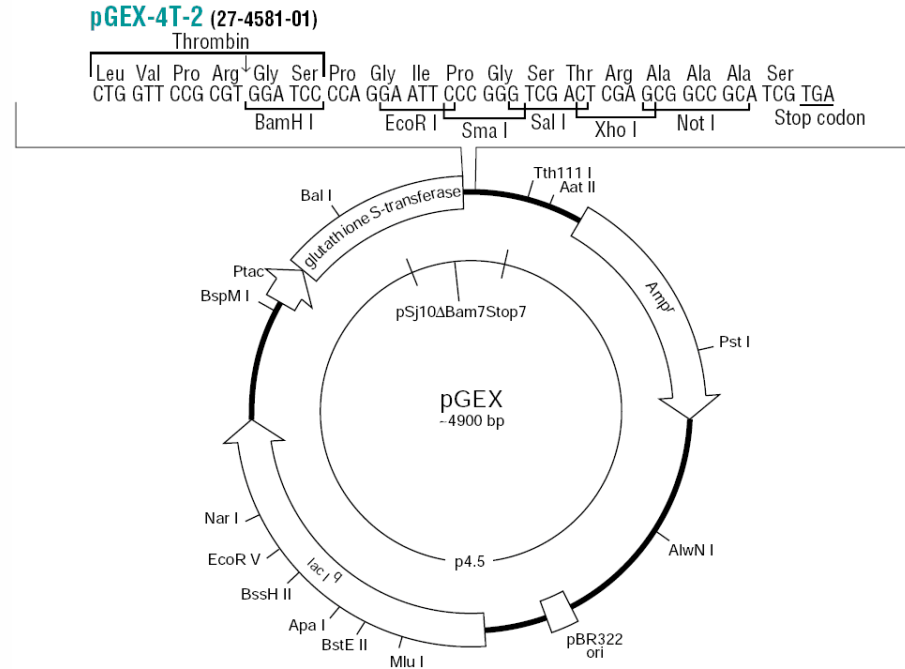
1. Origine di replicazione
2. Resistenza all'Ampicillina
3. Multiple cloning site (MCS)
4. Gene LacZ per lo screening blu/bianco



Credit: Invitrogen

# Esempio di plasmide - 2

1. Origine di replicazione
2. Resistenza all'Ampicillina
3. Glutathione-S-transferasi per la produzione della proteina di interesse



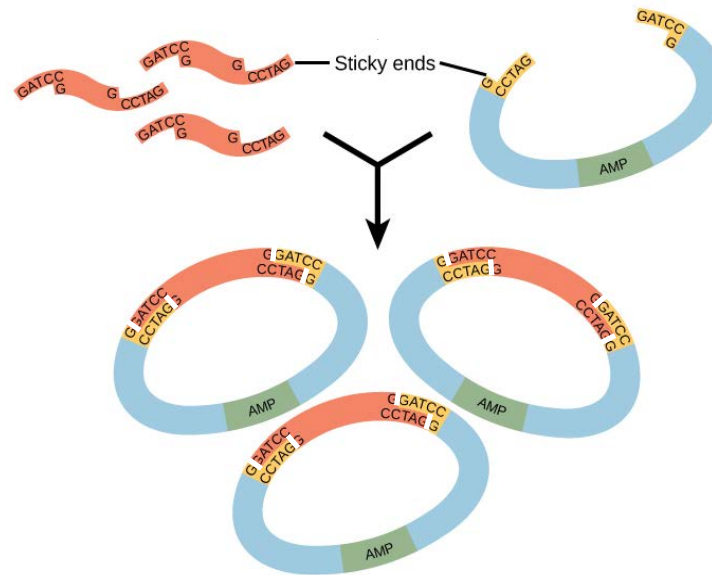
Credit: Invitrogen

# Vettori diversi per usi diversi

Tipo di vettore	Dimensioni inserto	Applicazioni
Plasmidi batterici	circa 6 - 10 kb	Clonaggio, subclonaggio, espressione proteine
Fago I	circa 20-25 kb	Librerie genomiche, librerie cDNA
Cosmidi	circa 45 kb	Librerie genomiche, librerie cDNA
BAC Cromosomi artificiali batterici	circa 300 kb	Librerie genomiche Analisi genomi
YAC Cromosomi artificiali di lievito	Da 200 a 2000 kb	Librerie genomiche Analisi genomi
Ti vector	variabile	Trasferimento genico nelle piante

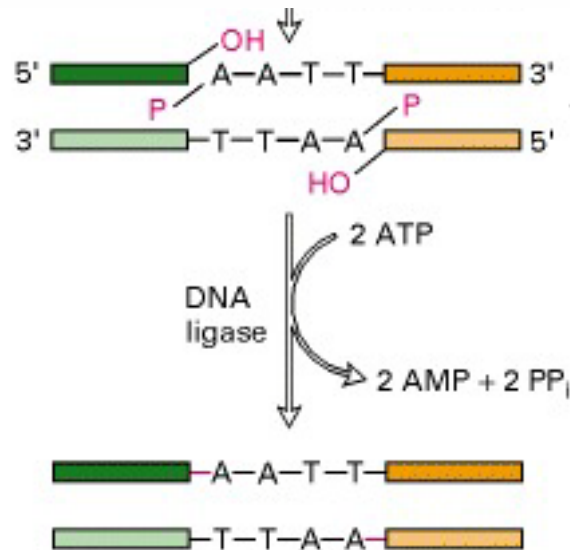
# Un'operazione di Taglia & Cuci

DNA e vettore tagliati con enzimi di restrizione



Come unire le estremità del vettore e dell'inserto?

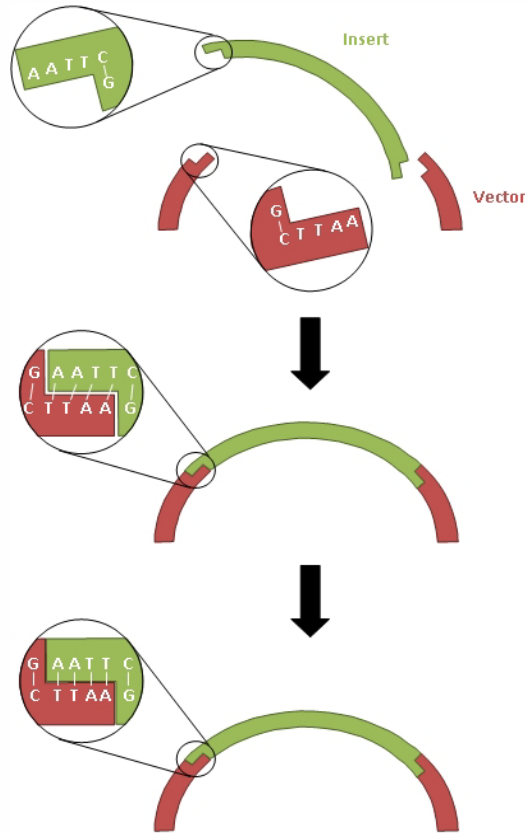
# Ligasi: la colla molecolare



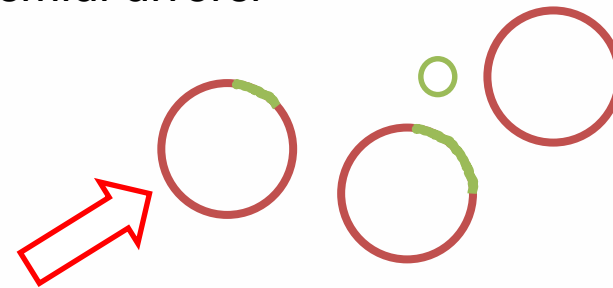
1. Enzimi che catalizzano la formazione del legame fosfo-esterico ( $--OH$  e  $--PO_4$  di due pezzi di DNA)
2. Nella tecnologia del DNA ricombinante sono usate per unire l'inserto al vettore
3. La reazione richiede energia (ATP)

Modified from Molecular Cell Biology, 4th edition 2000

# La Ligasi incolla due tratti di DNA



- Due tipi di Ligasi in lab: la T7 Ligasi e la T4 Ligasi (più usata)
- Rapporto Vettore:Inserto di 1:3
- Tanti fattori influenzano la reazione di ligazione (temperatura, pH, concentrazione DNA, dimensioni inserto, tipo di inserto ...)
- Alla fine della reazione di Ligazione si sarà formata una popolazione di plasmidi diversi



Modified from Diamantina Institute, University Queensland

# 3. Trasferimento nelle cellule

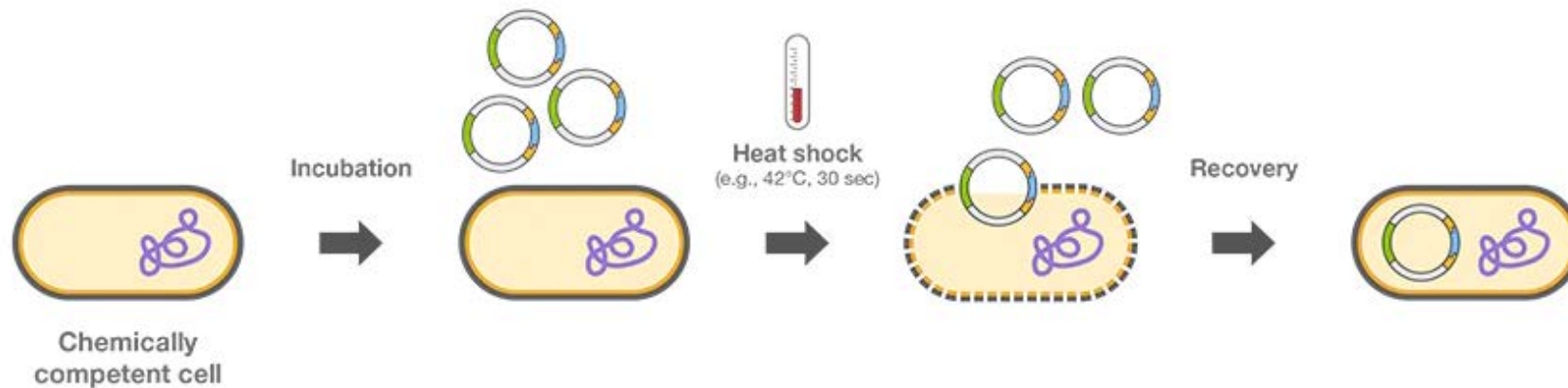


# Trasformazione batterica

1. Processo attraverso cui il DNA plasmidico entra in una cellula
2. Le cellule devono essere **competenti**, cioè capaci di acquisire DNA esogeno
3. Due possibilità: **metodo chimico** o **metodo fisico**

# Trasformazione con Calcio Cloruro

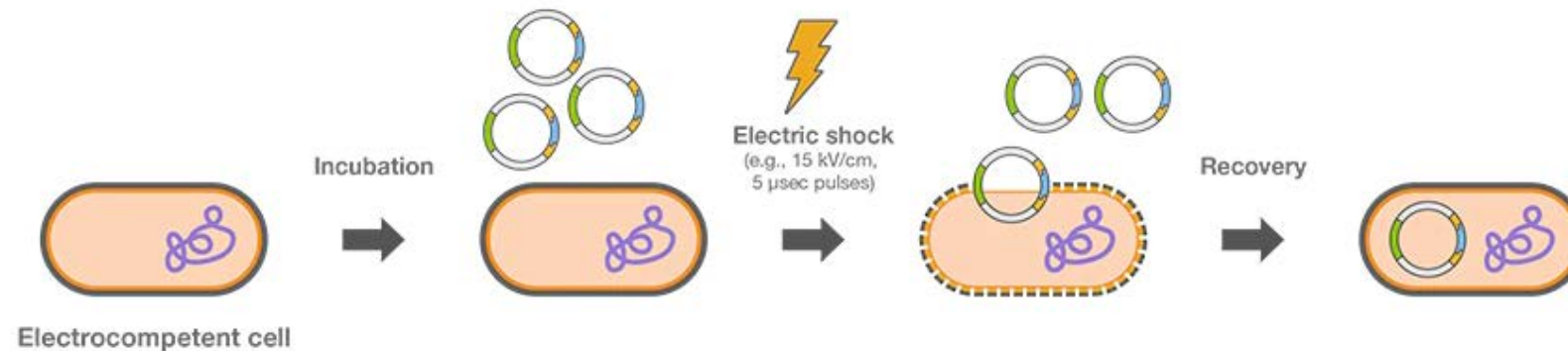
1. Il  $\text{CaCl}_2$  maschera le cariche negative del DNA, lo shock termico fa aprire pori nella membrana e il DNA entra nella cellula
2. Metodo chimico
3. Riproducibile, ma bassa efficienza ( $10^6$ - $10^9$  colonie per  $\mu\text{g}$  DNA)



Credit: Modified from thermofisher.com

# Trasformazione con elettroporazione

1. Le cellule sono sottoposte a uno shock elettrico, ciò crea dei pori transitori sulla membrana e consente l'ingresso del DNA
2. Alta mortalità delle cellule (circa il 50%), ma alta efficienza ( $10^{10}$  colonie per  $\mu\text{g}$  DNA)
3. Richiede un elettroporatore



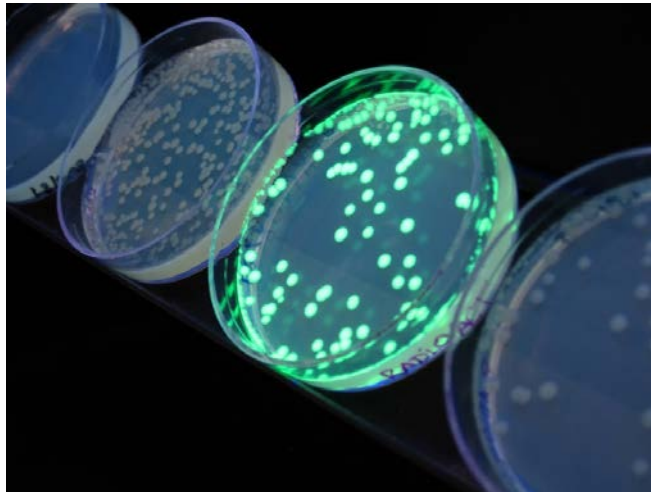
Credit: Modified from thermofisher.com

# 4. Identificazione dei cloni positivi

# Come riconoscere i cloni positivi?

## Marker per acquisizione

I cloni positivi **possiedono una caratteristica nuova** (es. resistenza a antibiotici, GFP)

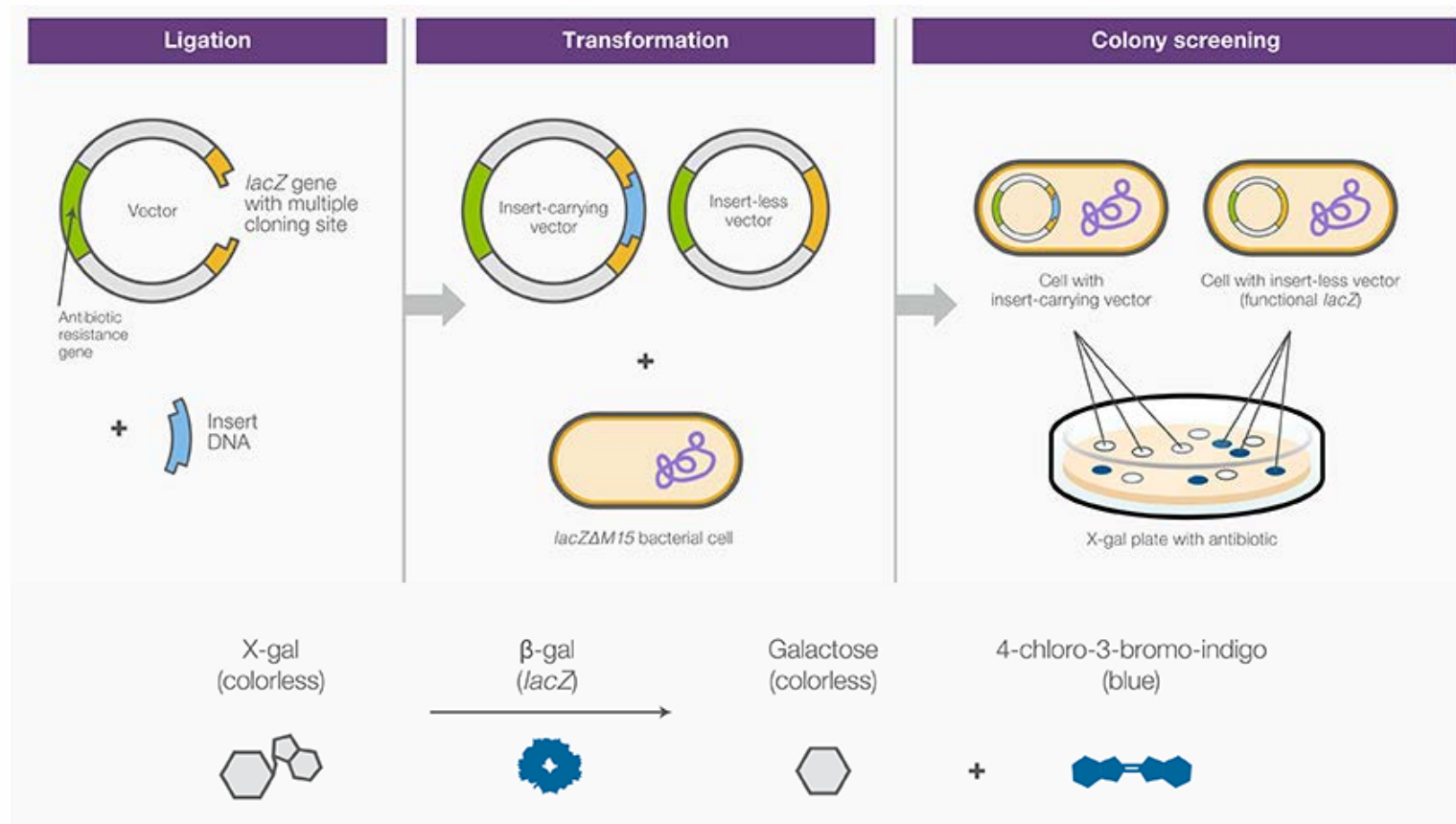


## Marker per inattivazione

I cloni positivi **perdono una caratteristica** (es. screening blu/bianco)

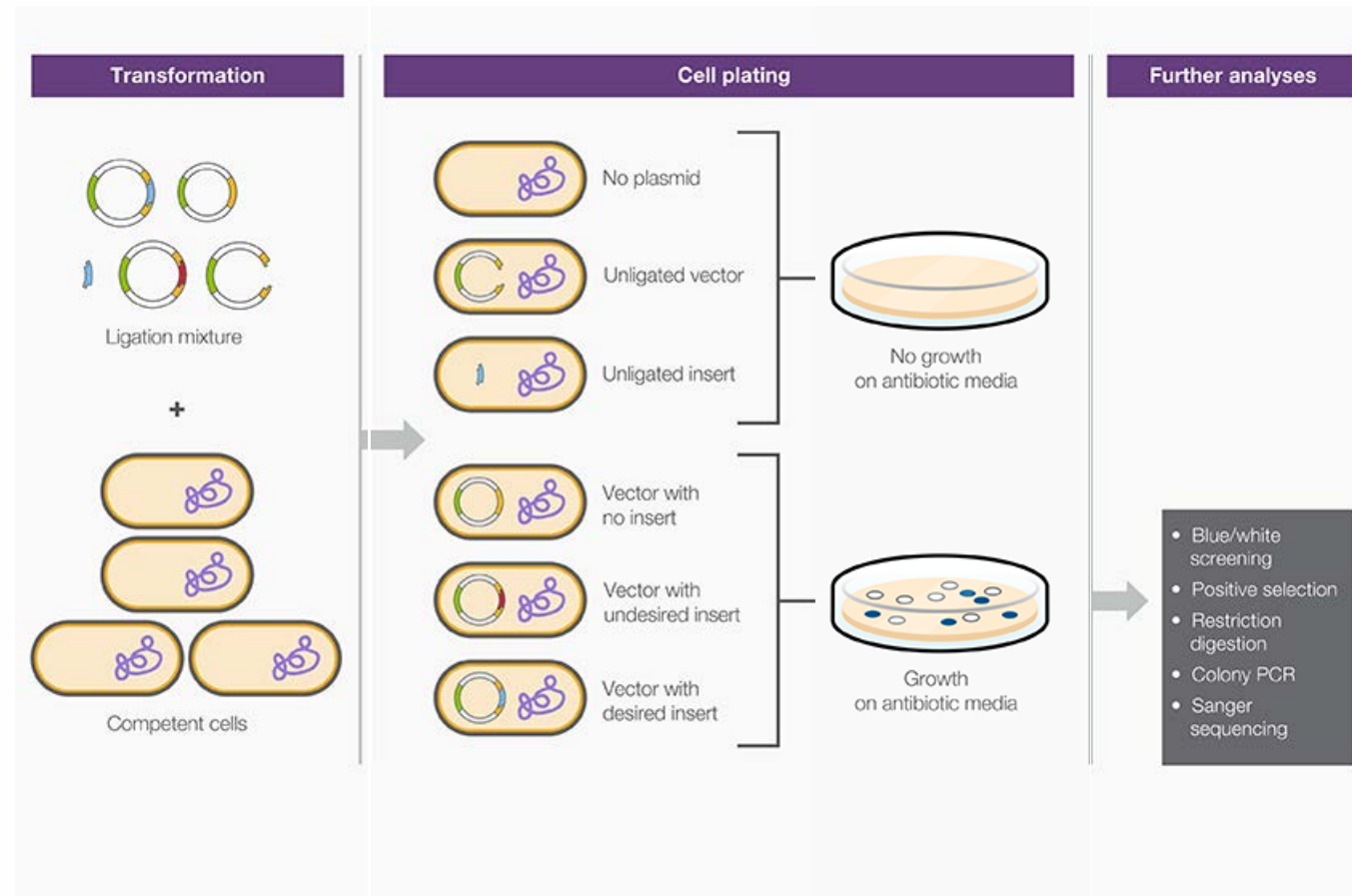


# Lo screening blu/bianco



Credit: Modified from thermofisher.com

# La situazione è in realtà più complessa...



Credit: Modified from thermofisher.com

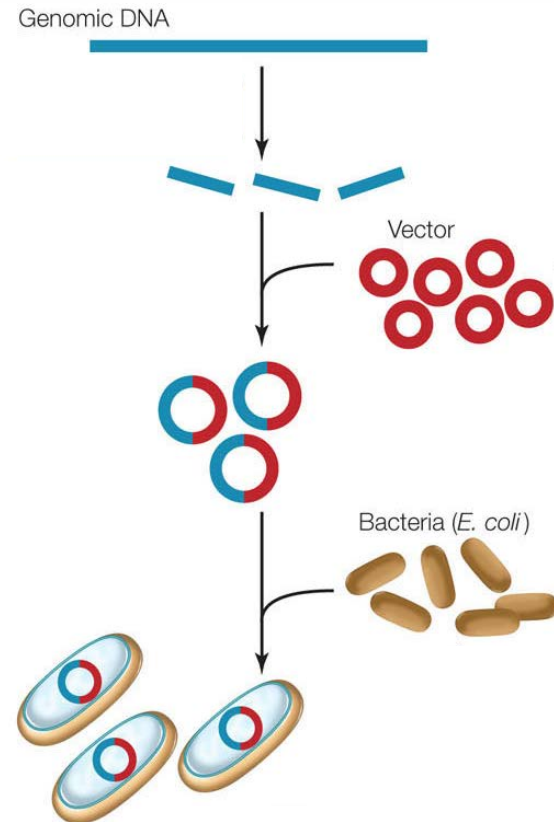


**Per cosa viene usato il DNA ricombinante?**

# 1. Studio dei geni

1. Se conosciamo il gene che ci interessa (sequenza, posizione sul genoma) e vogliamo isolarlo in modo specifico
2. Studi di **genetica inversa** (dal gene al fenotipo)
3. **Produzione di proteine** per studi strutturali

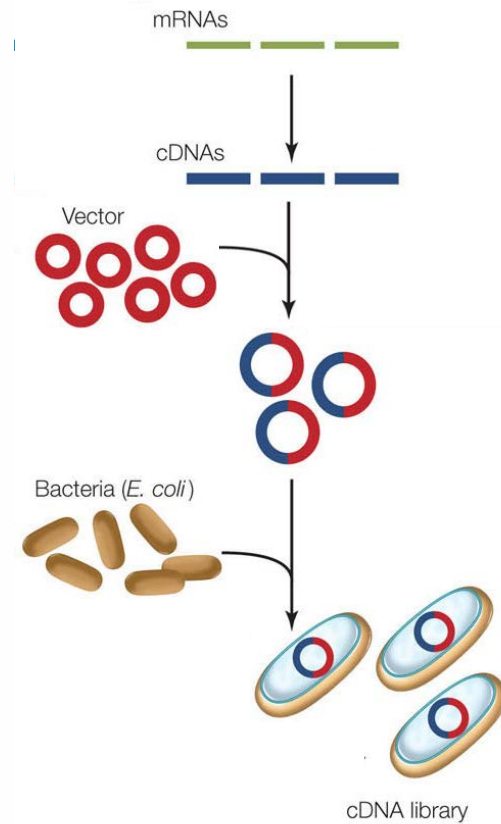
## 2. Clonaggio di una library genomica



Se utilizziamo DNA genomico e siamo interessati a creare una genoteca, cioè una rappresentazione di tutto il DNA genomico presente in un particolare organismo/cellula di interesse (**library DNA genomico**), come è stato fatto per il **progetto genoma umano**

Modified from Molecular Cell Biology, 4th edition 2000

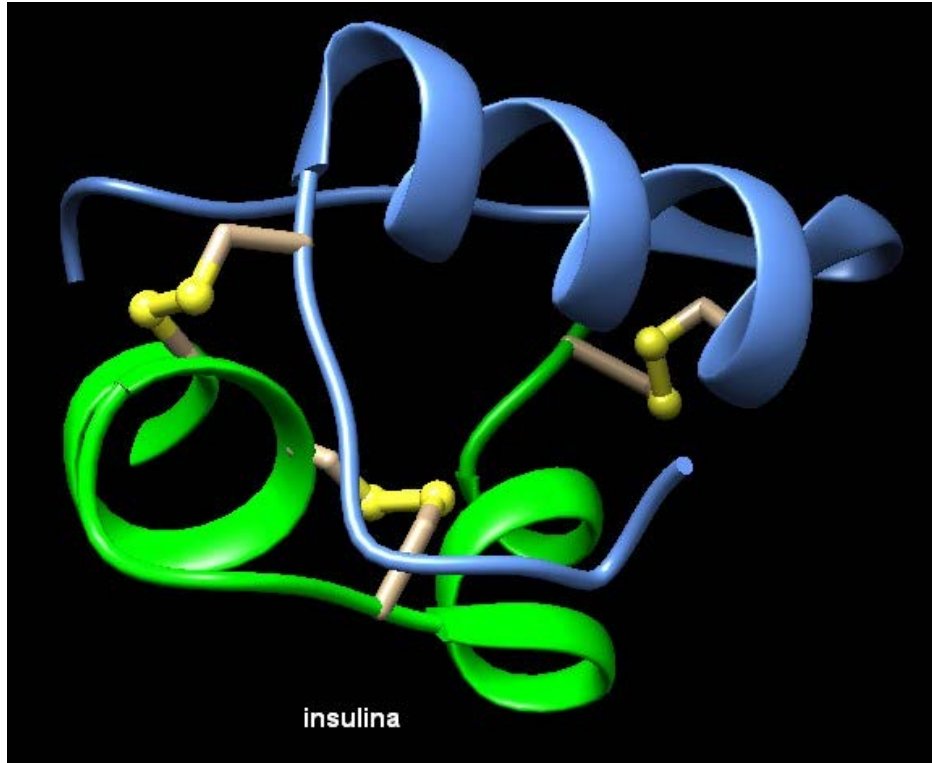
### 3. Clonaggio di una library di cDNA



Se siamo interessati solo ai geni espressi in un particolare organismo/cellula, il punto di partenza è l'mRNA che viene copiato in cDNA e usato per il clonaggio (**library cDNA**)

Modified from Molecular Cell Biology, 4th edition 2000

## 4. Produzione di proteine ricombinanti



Produzione di molecole di interesse farmaceutico:

- **farmaci:** insulina e ormone della crescita in *E.coli*.
- **molecole:** eritropoietina umana e fosfatasi alcalina umana (nelle cellule d'insetto), ormone stimolatore della tiroide (nel lievito *Hansenula polymorpha*)
- **antigeni** per la produzione di vaccini (vaccino per epatite B nel lievito *Pichia Pastoris*)

## 5. Produzione di piante OGM



### **Piante di cotone Bt**

Esempio di OGM di prima generazione  
(introduzione di tratti di resistenza ai parassiti)



### **Golden rice**

Esempio di OGM di seconda generazione  
(modifica di tratti qualitativi)

**Per approfondire questi temi: «Il contributo delle colture geneticamente modificate alla sicurezza alimentare: alcuni elementi per una riflessione AGRIREGIONIEUROPA.pdf» scaricabile gratuitamente dal web**

**consulta tutte le risorse didattiche su  
[www.fondazione diasorin.it](http://www.fondazione diasorin.it)**