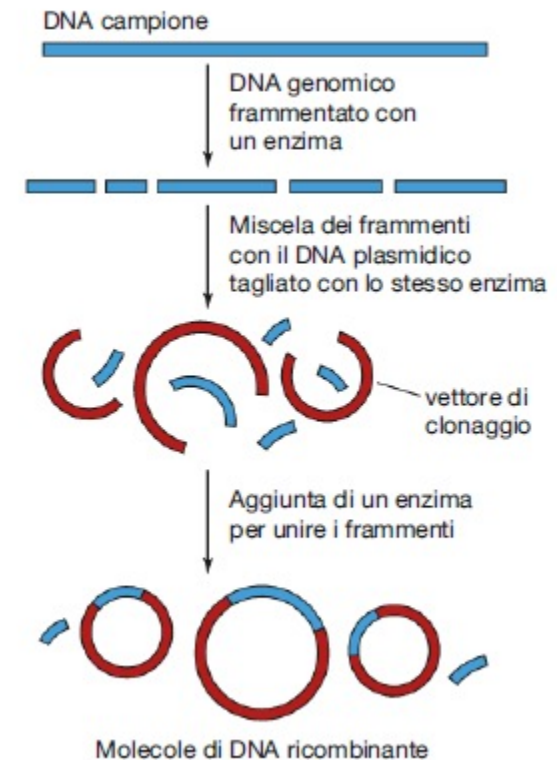


Come inseriamo il plasmide ricombinante nei batteri?

1. Il **gene** di interesse viene separato dagli altri geni dell'organismo di partenza
2. Il gene viene inserito all'interno di una molecola di DNA plasmidico modificata, (**vettore di clonaggio**).
3. Il DNA ricombinante viene inserito all'interno della cellula ospite (**trasfezione/trasformazione**)
4. Si isolano le cellule che hanno incorporato il plasmide
5. Il vettore si replica all'interno della cellula trasformata



I vettori plasmidici per trasferire i geni da un organismo all'altro

I **vettori plasmidici** sono molecole di DNA circolare a doppia elica lunghi alcune migliaia di nucleotidi usati per il clonaggio. **Sono i plasmidi batterici.**

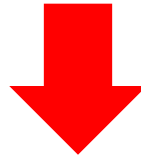
Tutti i vettori contengono alcuni elementi essenziali:

- un'**origine di replicazione** per consentirne la replicazione del plasmide a ogni divisione cellulare
- geni per la **resistenza ad antibiotici**, che agiscono come marcatori per selezionare le cellule che hanno incorporato il vettore
- un **sito multiplo di clonaggio** o *polilinker* in cui sono presenti numerose sequenze di riconoscimento per diversi enzimi di restrizione e dove, grazie a tagli di restrizione, viene inserito il frammento di DNA da clonare.

Il gene può entrare nella cellula ospite come parte integrante di un **vettore**, ovvero una sequenza che possiede anche un'origine di duplicazione (*ori*), uno o più siti di restrizione e almeno un gene reporter.

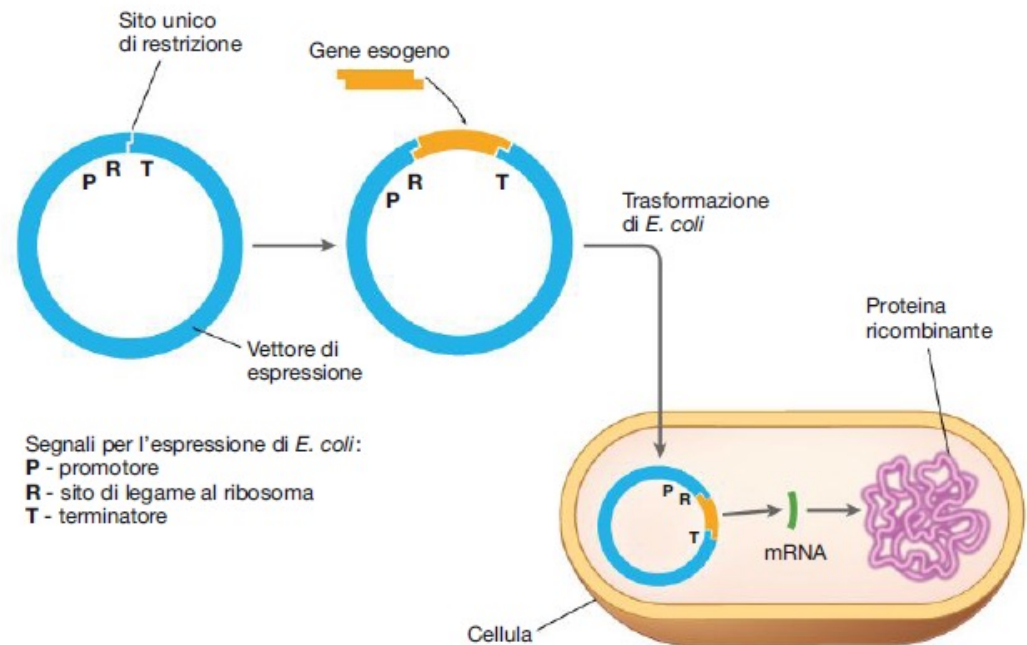
I vettori di espressione

Organismo geneticamente modificato o OGM



esprime un gene che deriva da un altro organismo

Per raggiungere questo scopo si usano dei vettori plasmidici particolari: i **vettori di espressione** consentono di fare esprimere il gene clonato al loro interno in una qualsiasi cellula ricevente.



Il clonaggio si avvale di vettori

Il **clonaggio** è la produzione in molte copie di un gene allo scopo di analizzarlo o per ottenere grosse quantità del prodotto che codifica.

Step 1

Inseriamo un gene di nostro interesse in un plasmide

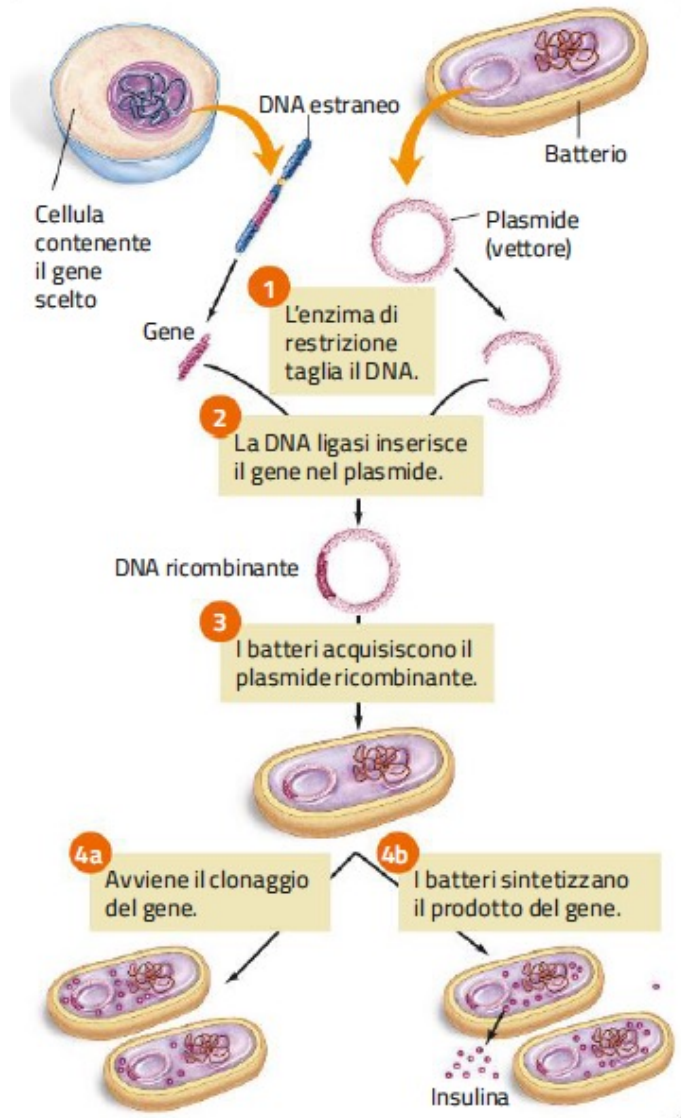
Step 2

Inseriamo il plasmide all'interno di una cellula ricevente (batterio) che esprimerà il nostro gene producendone la proteina.

I batteri si replicano ogni 20 minuti per scissione binaria creano 2 cellule identiche (cloni)

Ricapitoliamo:

singoli geni possono essere isolati, inseriti in batteri e quindi clonati



- Per clonare un gene, si estrae un *plasmide* da un batterio e il DNA con il gene di interesse da un'altra cellula.
- I frammenti di DNA vengono uniti dall'enzima **DNA ligasi** a formare un *plasmide ricombinato* (rDNA).
- Attraverso la trasformazione batterica si fa in modo che il plasmide penetri nel batterio; esso diviene così un **organismo geneticamente modificato (OGM)**, in grado di esprimere il gene estraneo.

Come inseriamo il plasmide ricombinante nei batteri?

1. Il DNA ricombinante viene inserito all'interno della cellula ospite per mezzo di diverse tecniche:

trasformazione

trasfezione

gene gun

microiniezione

Se la cellula è batterica usiamo la trasformazione

Se la cellula è eucariotica usiamo la trasfezione

2. Selezioniamo i batteri facendoli crescere su un terreno di coltura in presenza di determinati antibiotici (lo stesso utilizzato nel vettore di clonaggio) così solo quelli che hanno il plasmide con il nostro gene di interesse sopravviveranno

3. Espando la coltura dei batteri trasformati ...dopo 10 ore avrò 2^{30} cloni quindi moltissime copie del gene.

4. Estraggo e purifico il gene dai batteri

La reazione a catena della polimerasi o PCR

La **PCR** permette di ottenere milioni di copie della sequenza genica originaria partendo da un frammento di DNA.

1. Denaturazione. Una molecola di DNA contenente una sequenza che si desidera copiare viene riscaldata a 90 °C per separare i filamenti di DNA.

2. Ibridazione. Quando la miscela si raffredda, i primer artificiali si associano al DNA a filamento singolo.

3. Allungamento. I nucleotidi trifosfato e la Taq polimerasi consentono la sintesi di due nuovi filamenti di DNA.

4. Grazie alla ripetizione del processo, in poco tempo si possono ottenere milioni di copie del DNA originale.



CHE COS'E' IL FINGERPRINTING DEL DNA



Il fingerprinting del DNA (o impronta digitale del DNA) è una tecnica che permette l'identificazione individuale a livello molecolare, analizzando le caratteristiche uniche del DNA di un individuo.

L'applicazione del fingerprinting del DNA sta rivoluzionando la medicina forense, i test di paternità, l'identificazione di vittime di disastri.

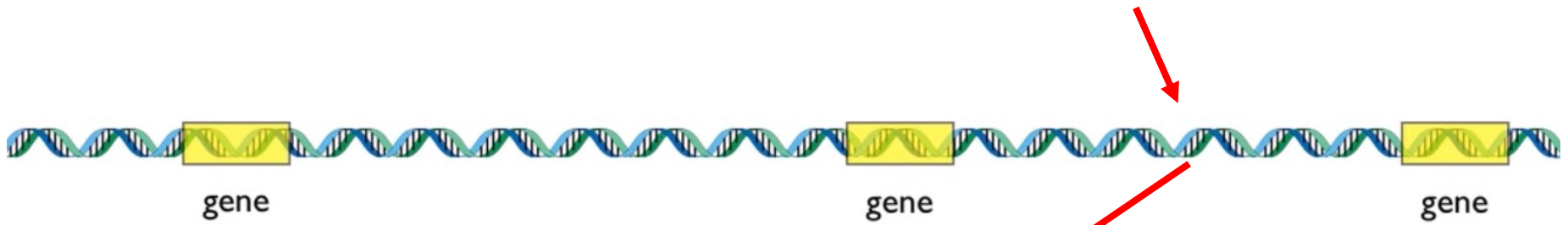


Il termine DNA fingerprinting fu usato per la prima volta nel 1984 da Alec Jeffreys, in analogia con le classiche impronte digitali basate sul disegno di creste sui polpastrelli delle dita, usate tradizionalmente per l'identificazione umana.

A differenza del fingerprinting classico, che analizza un tratto fenotipico, la tipizzazione del DNA analizza direttamente informazione genotipica.

La tecnica si basa sulla presenza nel DNA umano di sequenze altamente variabili che fanno sì che non esistano due individui (a parte i gemelli identici) con la stessa identica sequenza.

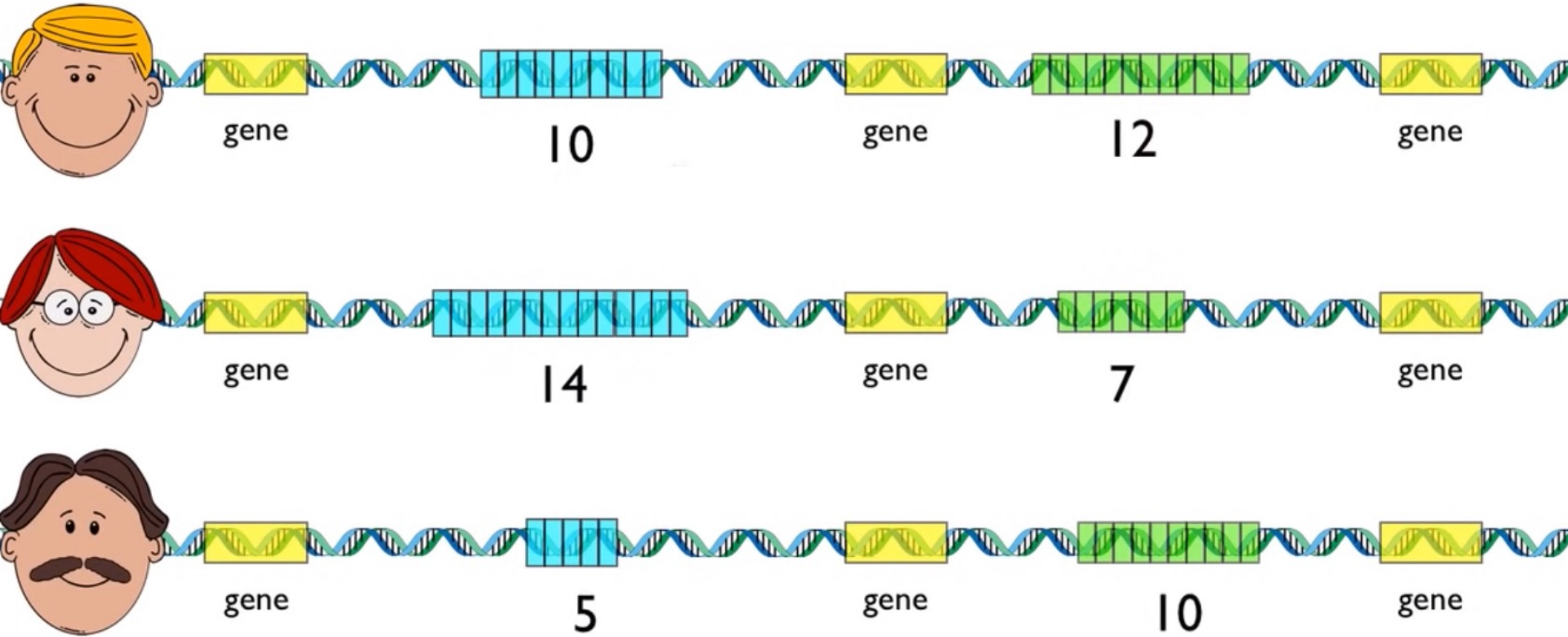
0.1 % variability



Short
Tandem
Repeats



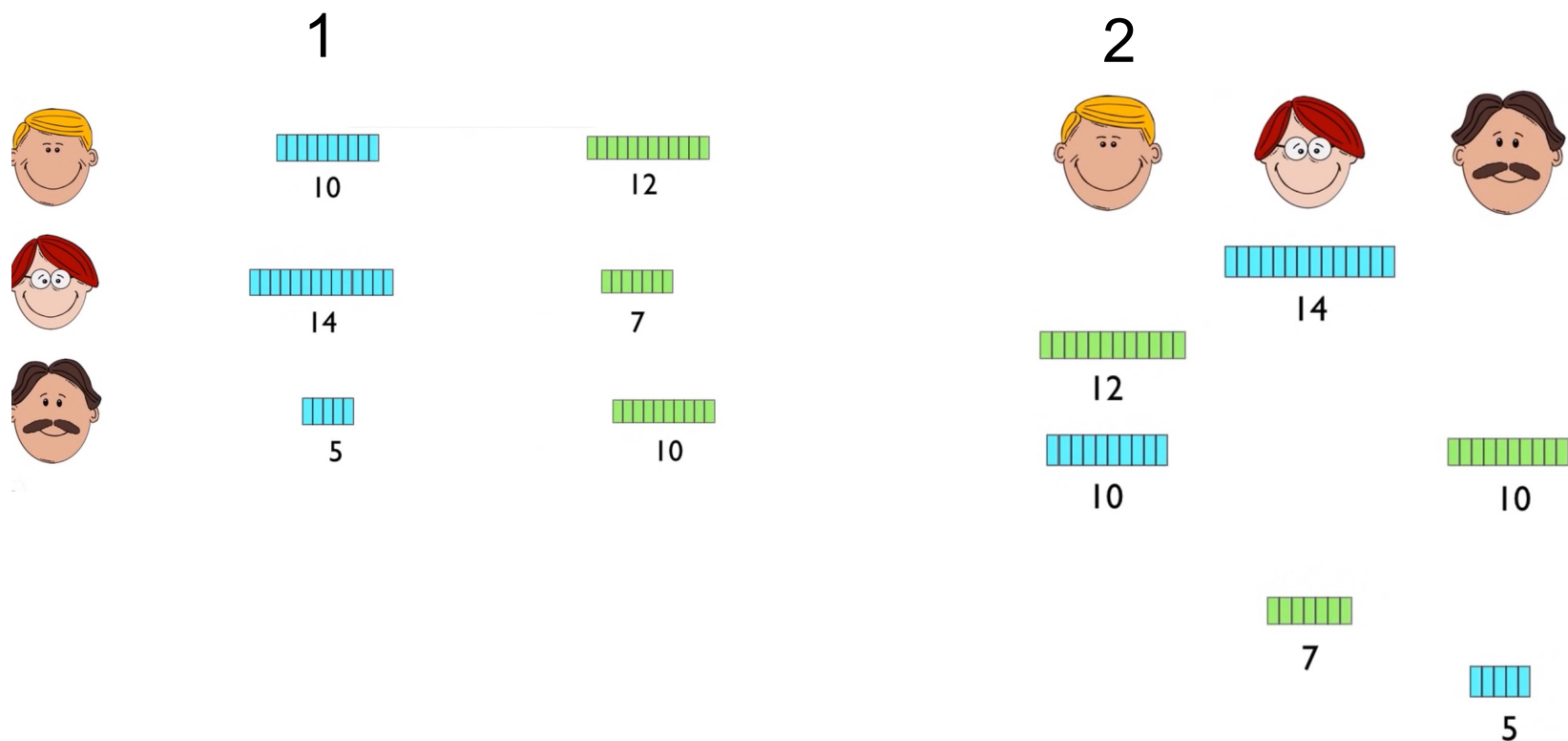
Le **sequenze polimorfiche**, o polimorfismi, sono tratti di DNA presenti in molte copie leggermente diverse tra di loro



Ogni individuo ha Short Tandem Repeats diverse (di diversa lunghezza): tratti azzurri e verdi.

Per ottenere l'impronta genetica di un individuo:

- si usano gli enzimi di restrizione per tagliare il DNA in corrispondenza delle **ripetizioni brevi in tandem (STR)**
- si amplificano con la PCR e
- si separano con elettroforesi su gel.



Solitamente si usano 13 STRs

Chi è l'omicida?





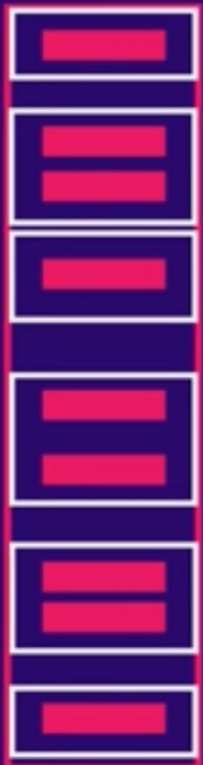
Blood
Stain

Suspect 1

Suspect 2












































Suspect 3

Suspect 4

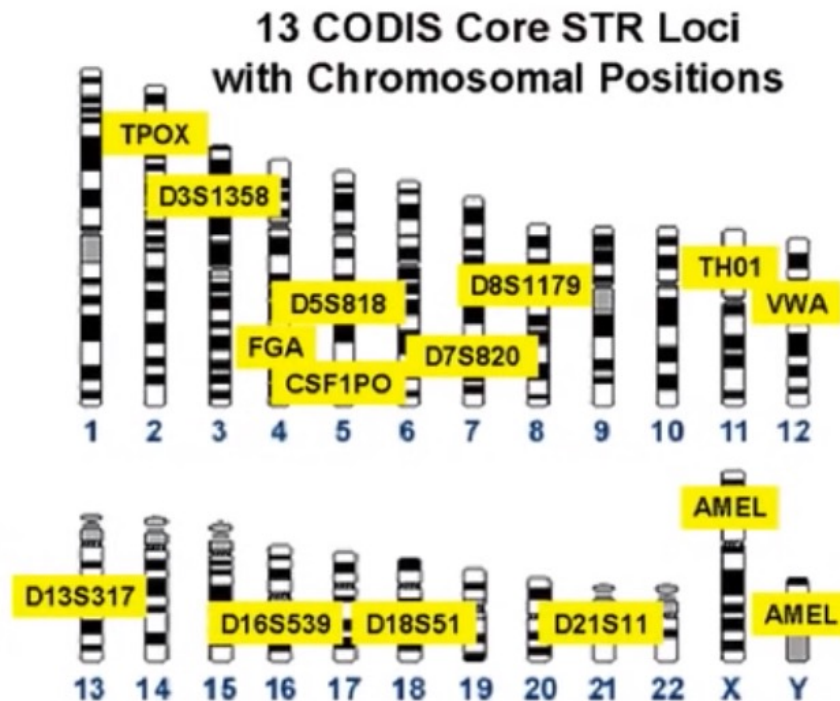


Chi è il soldato morto in guerra?

Soldier	Parents		Parents		Parents		Parents	
	A	B	C	D	E	F	G	H
1				Red	White	Orange	Green	Red
2	Yellow				Green		Red	
3	Green	Red	Yellow		Red			Yellow
4			Orange			Red		
5		Green			Yellow			
6		Yellow	Green	Green				
7	White				Red	White		
8	Red		Red					
9	Orange			Red		Green		
10				Yellow		Orange		
11				Green				Green
12		Red						
13		Yellow	Red				Yellow	
14			Red					

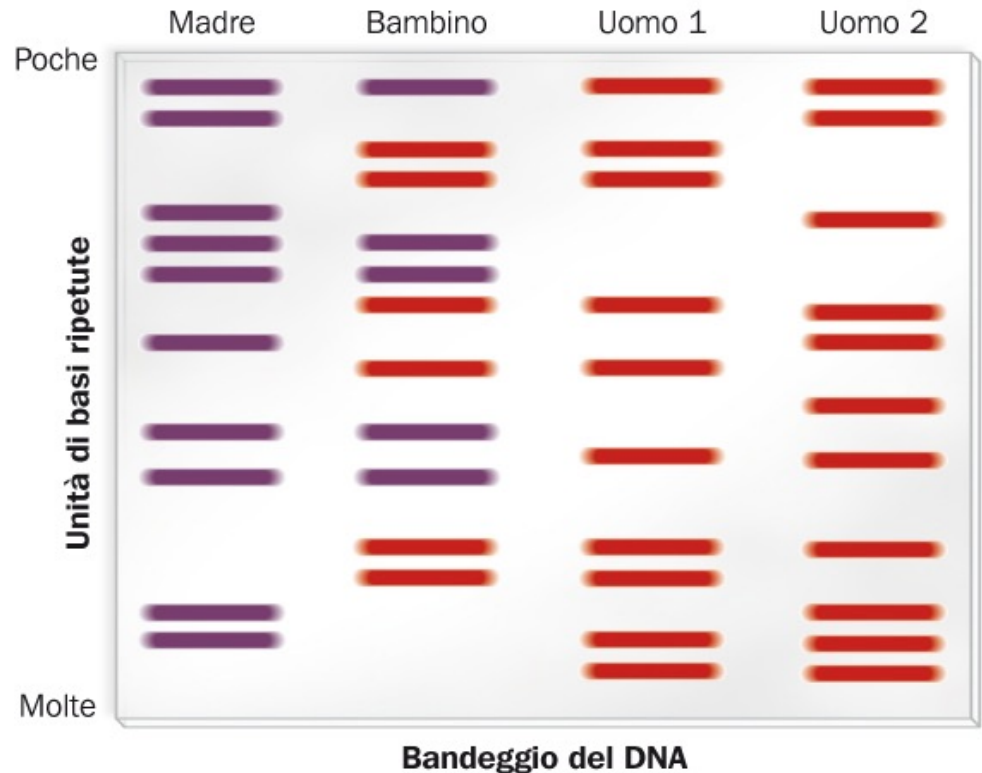
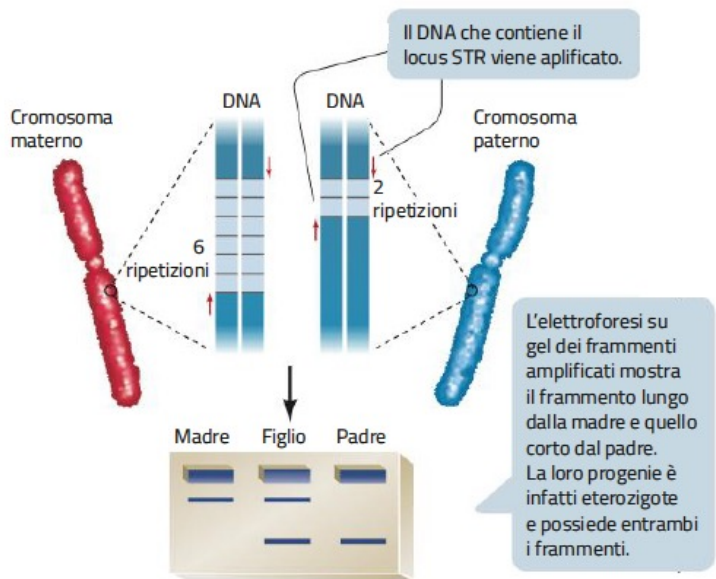
Soldier	Parents		Parents		Parents		Parents	
	A	B	C	D	E	F	G	H
								
								
								
								
								
								
								
								
								

CIA data base is in progress.....

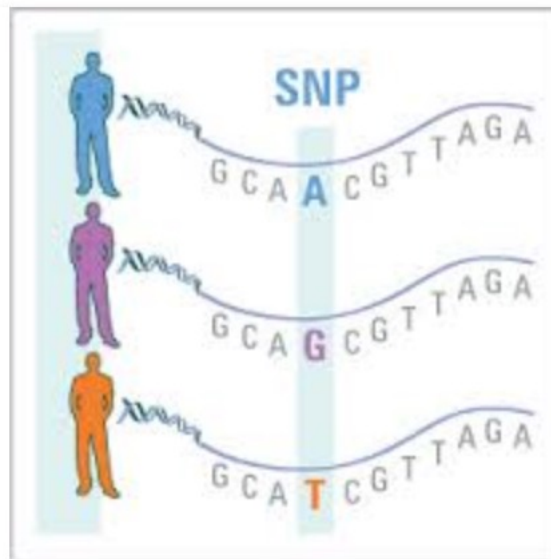


.....a little bit scary?

La PCR sta alla base di importanti analisi del DNA, come il **DNA fingerprinting** («impronta digitale» del DNA) e gli studi evolutivisti.



Il *DNA fingerprinting* di specifiche unità di basi ripetute in varie posizioni del genoma, per la determinazione di paternità tra due potenziali padri.



Ogni 1000 basi fisse del DNA individuale esiste una possibile variazione e l'elemento che si modifica viene chiamato **“SNP” Single Nucleotide Polymorphism**

Il 99.9% del genoma è identico per tutti mentre lo 0.1% è il solo responsabile delle variazioni e della specificità di ogni individuo.

Questi polimorfismi hanno un ruolo nell'indurre la suscettibilità specifica delle risposte dell'organismo nei confronti degli stimoli interni (endogeni) ed esterni (esogeni).

Per cui conoscendo i polimorfismi specifici dell'individuo è possibile, in termini di stima, valutare l'aumento del rischio specifico rispetto alla popolazione generale.

Ruoli degli SNPs

alterare l'espressione dei geni e causarne una maggiore o una minore quantità di una determinata proteina rispetto alla norma;

alterare l'efficienza delle proteine che vengono prodotte, provocando la produzione di proteine che funzionano male o che sono più instabili.

influenzare la sensibilità a varie intolleranze, alimentari (lattosio, glutine,) o cutanee o a predisposizioni a serie patologie come l'osteoporosi, le malattie cardiovascolari, l'Alzheimer, l'obesità.

contribuire alla produzione di sostanze coinvolte nei processi di difesa dell'organismo verso i danni ossidativi, mediati dai radicali liberi o all'attività infiammatoria con serie conseguenze sulla salute.

Questi polimorfismi sono quindi variazioni che possono predire il rischio individuale di sviluppare un disturbo. **Sono estremamente importanti perché danno la possibilità di conoscere la probabilità di sviluppare una patologia prima che si manifesti, e questo permette di fare prevenzione.**