

Lezione 1-2

martedì 9 Marzo 2010

corso Biologia applicata BU,
Ingegneria genetica BCM

libro di testo

un libro di testo con parte degli argomenti del corso è:

Biotechnologie molecolari

Principi e tecniche di Terry A. Brown

Zanichelli editore

argomenti del programma

ripassare e sapere il programma biologia molecolare

per quelli che non hanno dato o non danno biologia molecolare studiare e sapere:

- cosa è un gene e da cosa è costituito
- enzimi di restrizione
- analisi Southern
- analisi Northern (chi dice che un Northern si fa usando enzimi di restrizione non può passare l'esame)
- cosa vuol dire clonaggio e clonare
- cosa vuol dire isogenico
- differenza tra clonare cellule (batteriche o eucariotiche) e clonare un frammento di DNA

queste informazioni oltre che sul libro si trovano con google e anche su wikipedia in forma molto concisa e un po' superficiale, ma va saputa per bene almeno la tecnica

argomenti del corso:

diversi metodi di clonaggio utilizzati con i nuovi tipi di plasmide

vettori adattati per i diversi scopi di origine procariotica ed eucariotica (plasmidi/virus più altre componenti funzionali)

per frammenti genomici e sottoclonaggi

per geni o cDNA da far esprimere

per geni di fusione e geni reporter

per cotrasfettare con altri plasmidi per indurre l'espressione

per espressione in eucarioti ed in animali transgenici

per ricombinazione (estremità virali LTR)

per vettori con metodo FLP-TRex

per excisione e ricombinazione Cre-Lox

per RNA interference

PCR per tutti gli usi

tecnica di base classica
metodo

vari tipi di applicazioni:

- nested
- inversa
- RT-PCR
- RACE 3'
- RACE 5'

uso di linkers
AFLPs, analisi SNPs
e altri polimorfismi
mutagenesi Nucleotidi singoli
mutagenesi per frammenti più grandi

sequenziamento del DNA aggiornato

la corsa verso “whole genome” diventa una routine

microarrays (resequencing anche per polimorfismi)
metodo pirosequenziamento

genomica ? dal piccolo al grande e dal grande al piccolo
(dai cromosomi alla sequenza e viceversa)

il cerchio si chiude ?

la conoscenza dei genomi cosa ha cambiato e sta
cambiando ?

RNA interference

small RNAs

le basi molecolari del fenomeno

le possibili applicazioni, come si può utilizzare, in quali casi

le metodologie sviluppate per quali domande della Biologia sono applicabili

animali transgenici

tecniche semplici e su organismi diversi e vegetali

sul topo:

per ricombinazione omologa

per knock out (e knock in?)

vettori specifici

metodo Cre-Lox

induzione tessuto specifica

mutanti condizionali

cominciamo con i vettori di clonaggio

una delle rivoluzioni in biologia fu la constatazione che qualunque DNA una volta purificato si manipolava nello stesso modo a prescindere dalla sua origine di specie

la stessa cosa vale per le proteine

il materiale biologico è universale

così come i minerali che anche su Marte e sulla Luna sono identici

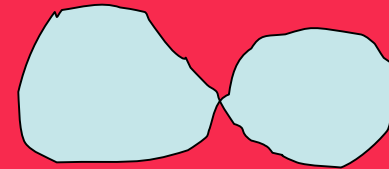
il plasmide è circolare però non è rigido

è una molecola di DNA circolare procariotica manipolata e con diversi enzimi unita ad altre strutture di DNA per consentirgli nuove funzioni utili.

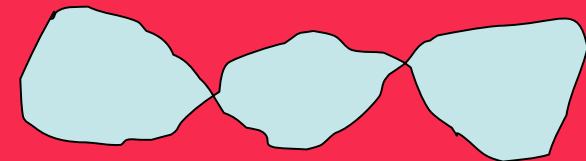
Queste molecole assemblate artificialmente sono stati chiamati vettori

assume forme diverse
non casuali

si avvolge

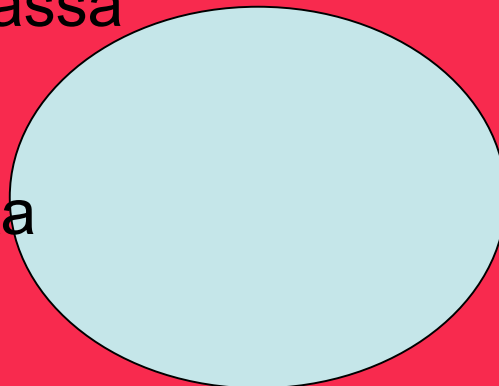


si superavvolge



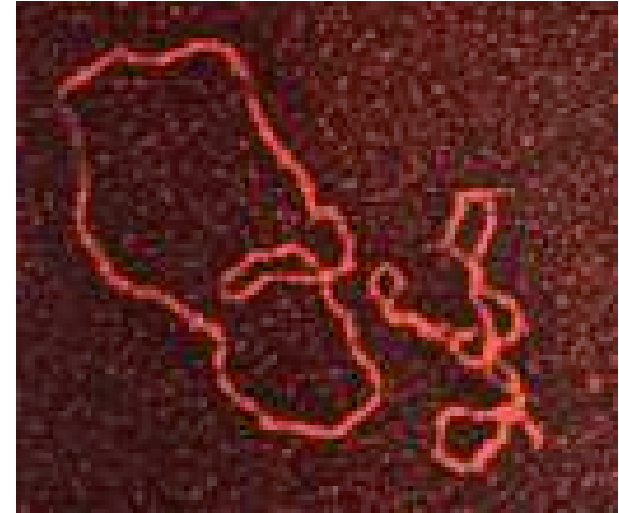
o si rilassa

la forma rilassata



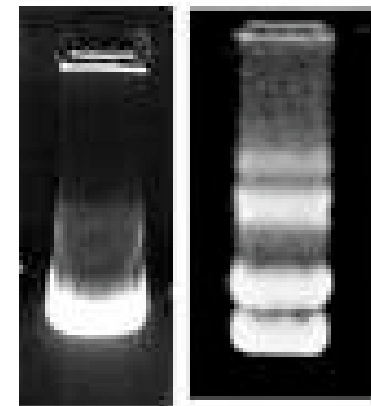
come si vede al Microscopio Elettronico

come si estrae?
come si purifica?
è più resistente del DNA lineare



come si può analizzare ?

su gel di agarosio corre in modo diverso
come se avesse pesi diversi



rilass. avvolto
 super avv.

la loro importanza dovuta al clonaggio

il primo che capì l'uso dei plasmidi per il clonaggio si pose giustamente dei problemi etici

possiamo trasferire l'informazione genetica dove si vuole ?

la prima volta fece impressione

si trattava di organismi procarioti

l'idea di pericolo e la paura successiva derivano dalla possibilità di trasformare una informazione genetica che diventa definitiva e non più solo somatica

i cloni e clonare

sono colonie di cellule derivate da una unica cellula progenitrice

tutte le cellule di un clone sono isogeniche (salvo mutazioni intercorse)

assolutamente vero per tutti gli organismi (esclusi i mosaici)

anche gli eucarioti sono un clone a partire dallo zigote

il differenziamento causa la diversità fenotipica

cosa sottointende clonare

l'assunto è far partire una crescita da una singola cellula

bisogna esser capaci a fare isolamenti di singole cellule

in microbiologia e bio cellulare si parte da diluizioni estreme

in genetica molecolare clonare ha preso il significato di isolare un frammento di DNA inserendolo in un vettore per manipolarlo e riottenerlo insieme al vettore che si moltiplica all'interno dell'organismo o delle cellule in cui è stato inserito, secondo le diverse funzioni del vettore

cosa ci vuole per clonare ?

la scoperta dei plasmidi

ci voleva l'associazione con gli enzimi di restrizione

molti ricercatori producevano gli enzimi di restrizione da sé

anche le ligasi erano meno efficienti

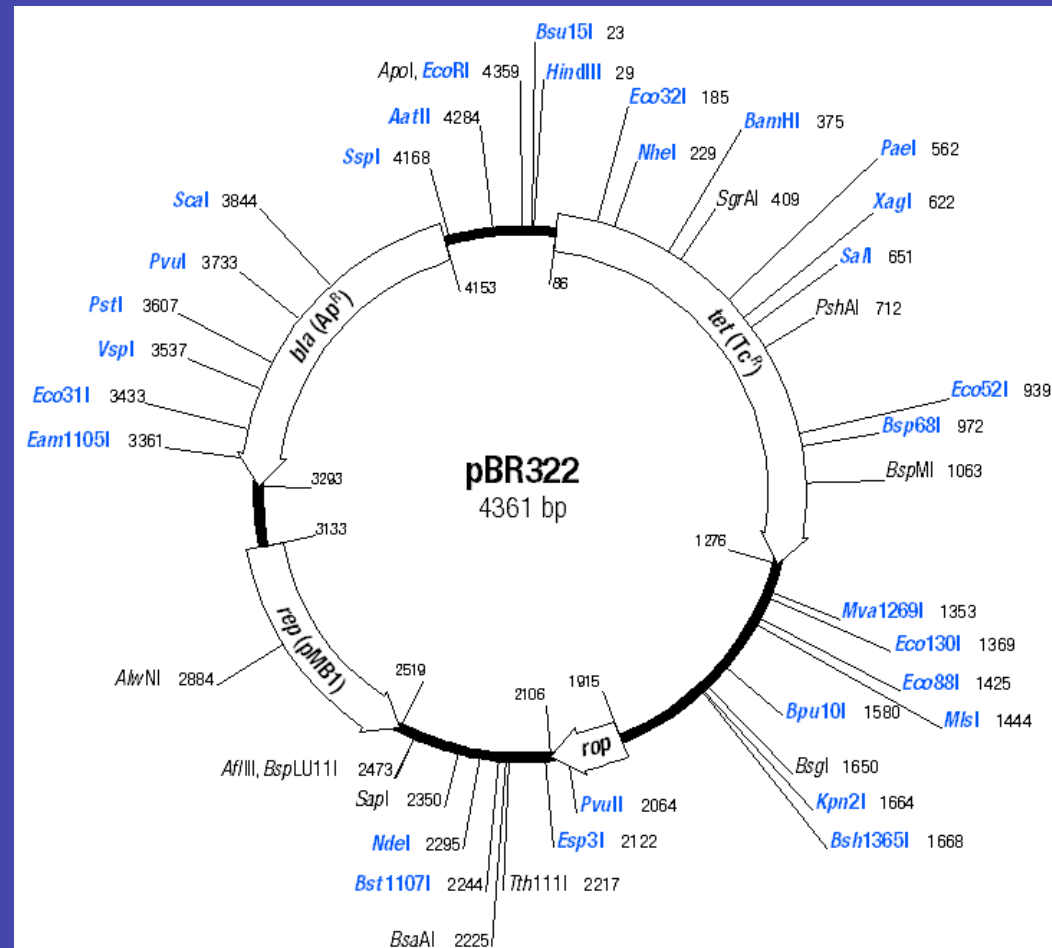
procedimento: purificazione del DNA da manipolare

plasmide e inserto

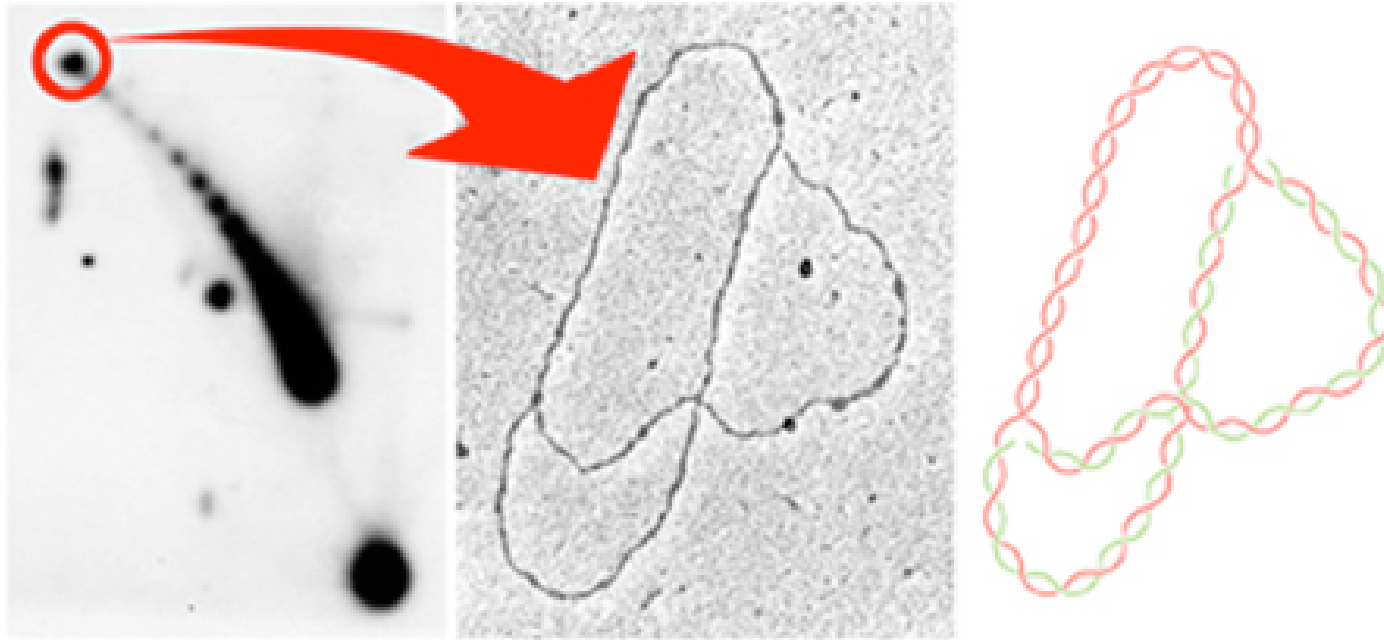
estrazione da coltura batterica, lisi, centrifuga (togliere membrane e particolato) eliminazione proteine, estraz. ac. nucleici, lisi DNA genomico arricchimento DNA plasmidico circolare, (proteinasasi, fenolo, cloroformio) purificazione su gel di frammenti di restrizione, colonnine di silica o chelex o altro che lega ac. nucl., lavaggio ed eluizione in volume concentrato

pBR322 da ColE1

The plasmid pBR322 is one of the most commonly used E.coli cloning vectors. pBR322 is 4361 bp in length and contains: (1) the replicon rep responsible for the replication of plasmid (source - plasmid pMB1); (2) rop gene coding for the Rop protein, which promotes conversion of the unstable RNA I - RNA II complex to a stable complex and serves to decrease copy number (source - plasmid pMB1); (3) bla gene, coding for beta-lactamase that confers resistance to ampicillin (source - transposon Tn3); (4) tet gene, encoding tetracycline resistance protein (source - plasmid pSC101). GenBank/EMBL accession numbers J01749, K00005, L08654, M10282, M10283, M10286, M10356, M10784, M10785, M10786, M33694, V01119.



l'origine di replicazione



clonando cose più complicate

le libraries genomiche o analisi Southern
erano i punti di partenza

clonare nei plasmidi : studio riduzionista

dalle analisi Southern deriva la necessità di clonare

clonare per approfondire l'analisi su struttura e sequenza

si vuole isolare l'intero gene

c'è anche l'esigenza di analizzare i geni eucariotici

però questi hanno gli introni
si può ricorrere al cDNA

dai procarioti agli eucarioti

clonare i geni eucariotici è più complesso

non sono policistronici, hanno gli introni

la scoperta degli introni e della RT (reverse transcriptase)

gli mRNA si possono produrre in forma di cDNA

clonare un cDNA è meno complicato perchè è “piccolo”
(sono esclusi gli introni)

le libraries di DNA

le libraries genomiche per trovare i geni interi mappati e studiati per analisi Southern, ci vogliono sonde per le ibridazioni e per andare a pescare i cloni delle libraries

ci vogliono le libraries genomiche rappresentative (più copie di uno stesso gene per unità di vettori)

le libraries di cDNA sono diverse per grandezza di inserto e per provenienza del cDNA.

venivano fatte da tessuti diversi per trovare i geni tessuto specifici o più abbondantemente espressi in certi tessuti

il secondo salto è la library

poter avere tutto un genoma o tutto un trascrittoma
in una collezione di plasmidi ha aperto nuove possibilità

però cambiano i vettori

come?

da pBR322 a PUC ai cosmidi e fasmidi