

Corso di Laurea in Biotecnologie
Laurea Specialistiche in Biotecnologie Genomiche
Programma del corso di Ingegneria Genetica e Terapia Genica
Prof. Carlo Presutti

Reazioni enzimatiche in vitro su acidi nucleici: Enzimi di restrizione. Enzimi di modificazione. Trascrittasi inversa. Marcature del DNA e dell' RNA

Polymerase chain reaction e sue applicazioni. Sintesi di oligonucleotidi.

Sequenziamento del DNA. Nuovi sistemi di sequenziamento "massivo" o "Deep Sequencing"

Ibridazioni molecolari: Southern, Northern, Western, Southwestern, ibridazioni su colonia, in situ.

Vettori di clonaggio procariotici. Trasformazione di cellule procariotiche. Vettori di espressione. Librerie genomiche e a cDNA. Mutagenesi in vitro.

Espressione di proteine in E.coli, in S.cerevisiae e in cellule eucariotiche superiori

Metodi di analisi di interazioni proteine-Acidi Nucleici. Footprinting, band-shift.

Il sistema sperimentale di lievito vettori, marcatori, sistemi di selezione. Il lievito come modello per studiare il ciclo cellulare e l' espressione genica.

Vettori eucariotici animali: sistemi di trasfezione e selezione. Integrazione omologa o eterologa.

Cenni sulle Malattie genetiche e Terapia Genica

Progetti genoma. Strategie, Banche dati, organismi modello. Microarrays, "Trascrittoma" e " Proteoma", spettrometria di massa

Bioinformatica: Programmi in rete per ricercare omologie di sequenze nucleotidiche o aminoacidiche

Testi consigliati:

Rose, Ingegneria Genetica - **Alberts**, Biologia Molecolare della Cellula

Watson, Il DNA ricombinante – **Reece**, Geni e Genomi

Brown, Biotecnologie Molecolari

Passaggi principali nello sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante

- 1869 - Isolamento del DNA
- 1944 - Dimostrazione che il DNA porta l'informazione genetica
- 1953 - Struttura a doppia elica del DNA
- 1955 - Dna polimerasi
- 1961 - Denaturazione e rinaturazione del DNA
- 1962 - Enzimi di restrizione
- 1966 - Codice Genetico
- 1972 - Prime tecniche di clonazione
- 1975 - Ibridazione molecolare
- 1975 - Sequenziamento del DNA - Sequenziamento di Genomi - 1977-oggi
- 1977 - Prima Biotech company - Genentech
- 1981 - Topi transgenici
- 1982 - Nascita di GenBank
- 1985 - PCR
- 1989 - 2-Hybrid
- 1990 - Blast
- 1991 - Sequenziamento automatico
- 1995 - Primo genoma: Haemophilus influenzae
- 1997 - Microarrays
- 2001 - Genoma umano
- 2007 - Next Generation Sequencing
- 2013 - CRISPR-Cas9

DNA ricombinante: Tecniche di base

Trasformazione - Vettori

Elettroforesi

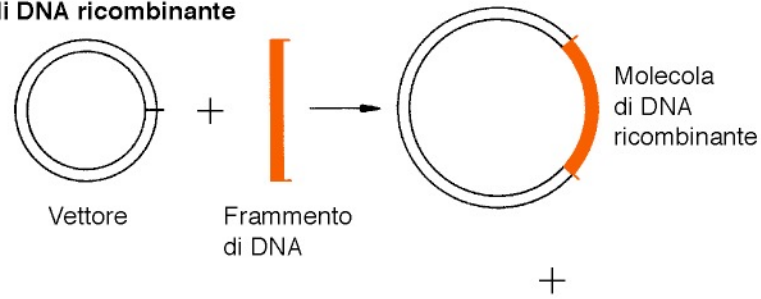
Trasferimento di Acidi Nucleici e Proteine

Ibridazione

Sequenziamento

PCR

1 Costruzione di una molecola di DNA ricombinante



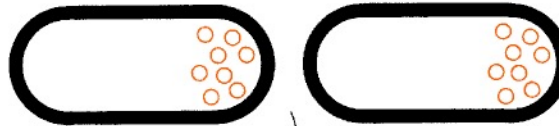
2 Trasporto nella cellula ospite



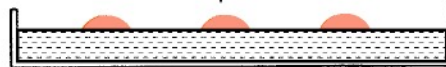
3 Moltiplicazione della molecola di DNA ricombinante



4 Divisione della cellula ospite

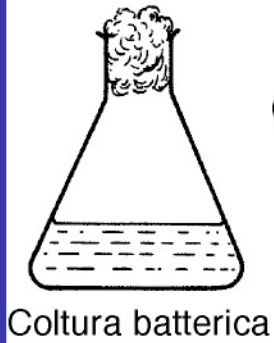


5 Numerose divisioni cellulari portano a un clone

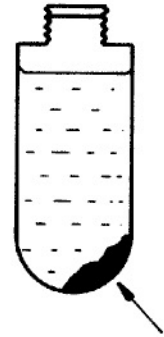


Colonie batteriche che crescono su un mezzo solido

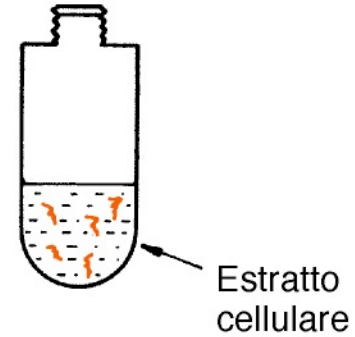
1 Una coltura di batteri viene fatta crescere e viene raccolta



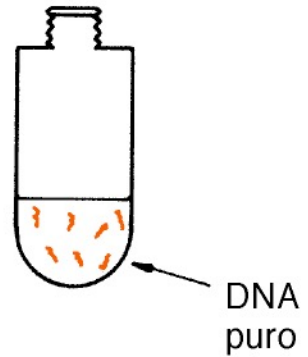
Centrifugazione



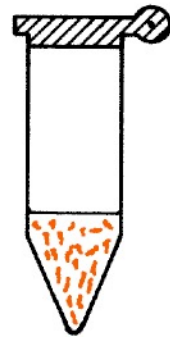
2 Le cellule sono rimosse e rotte per ottenere un estratto cellulare



Sedimento di cellule

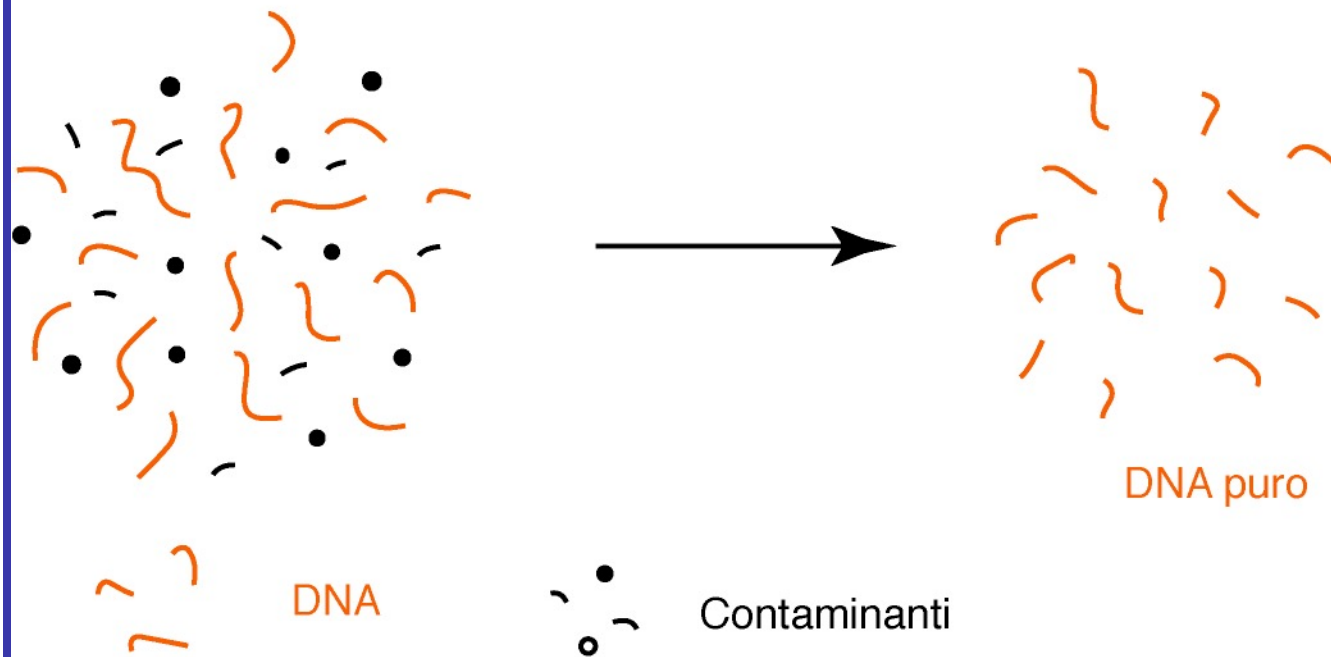


4 Concentrazione del DNA

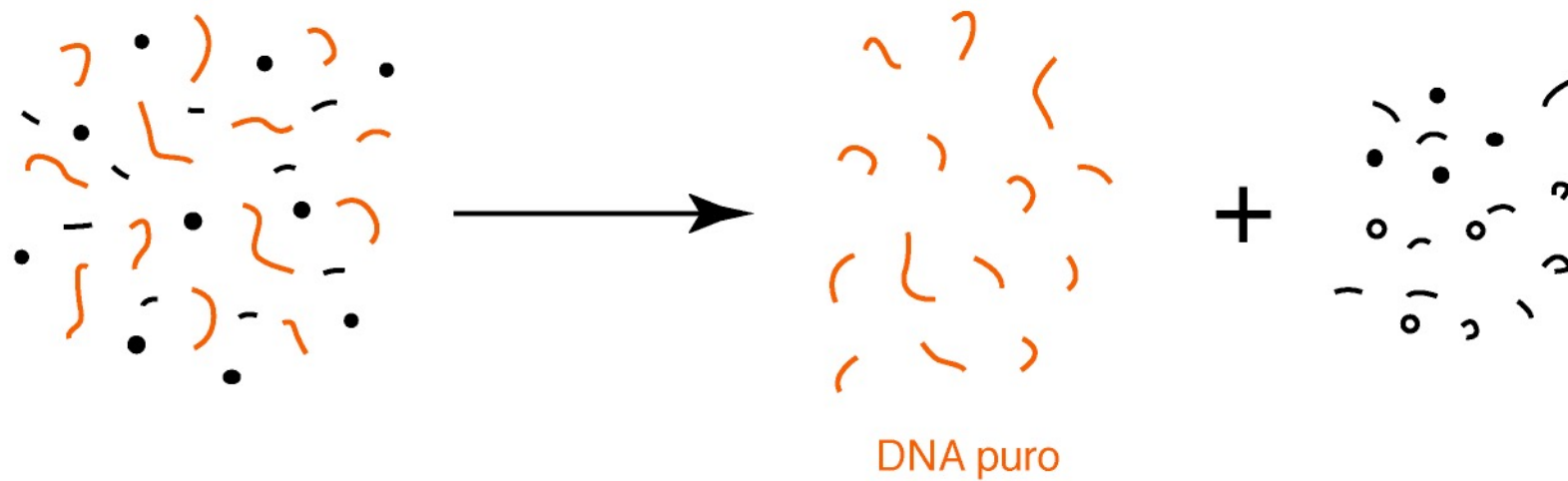


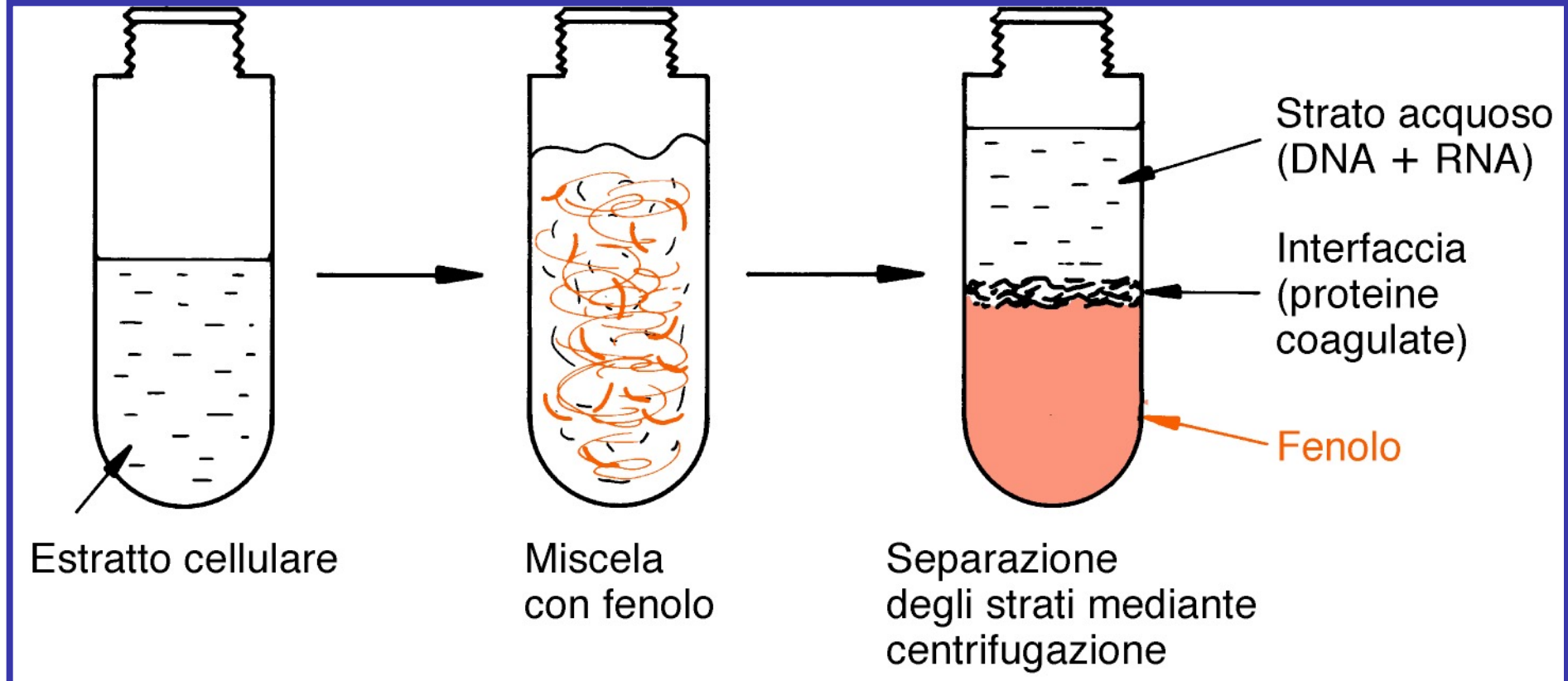
3 Purificazione del DNA dall'estratto cellulare

(a) Degradazione dei contaminanti

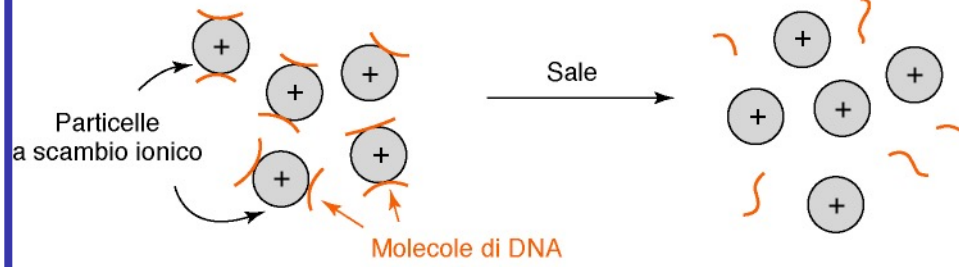


(b) Separazione del DNA dai contaminanti

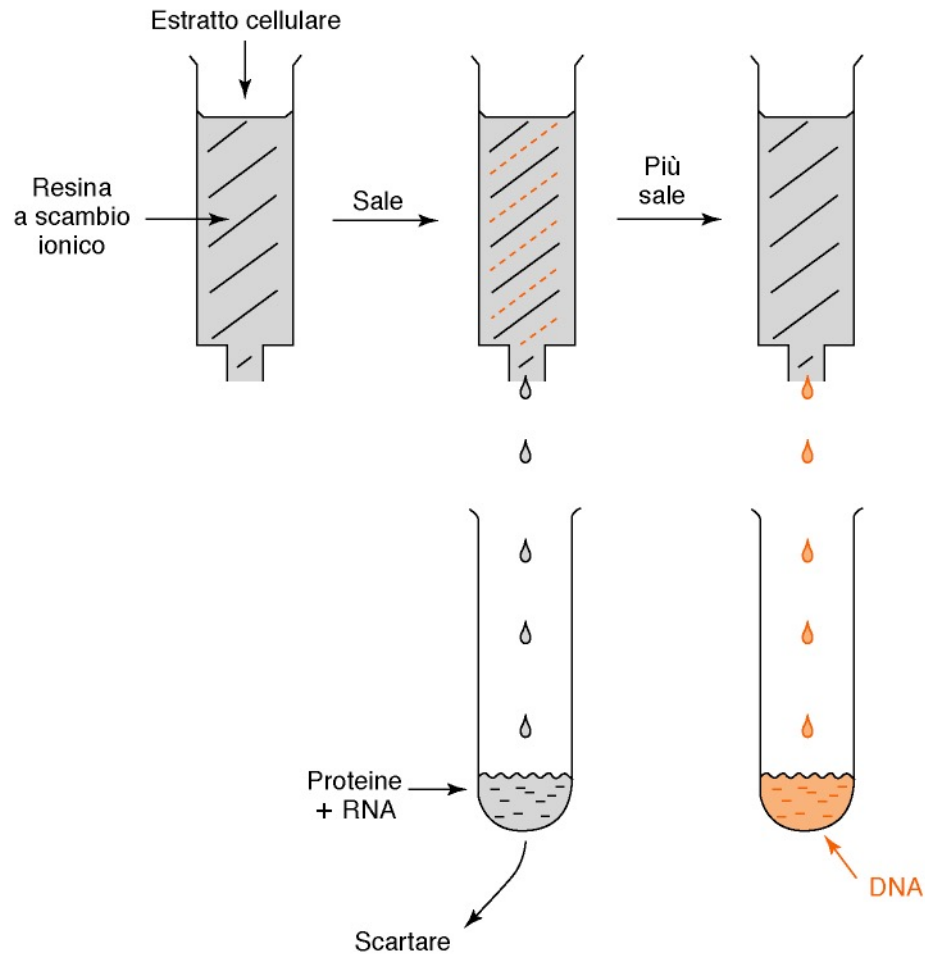


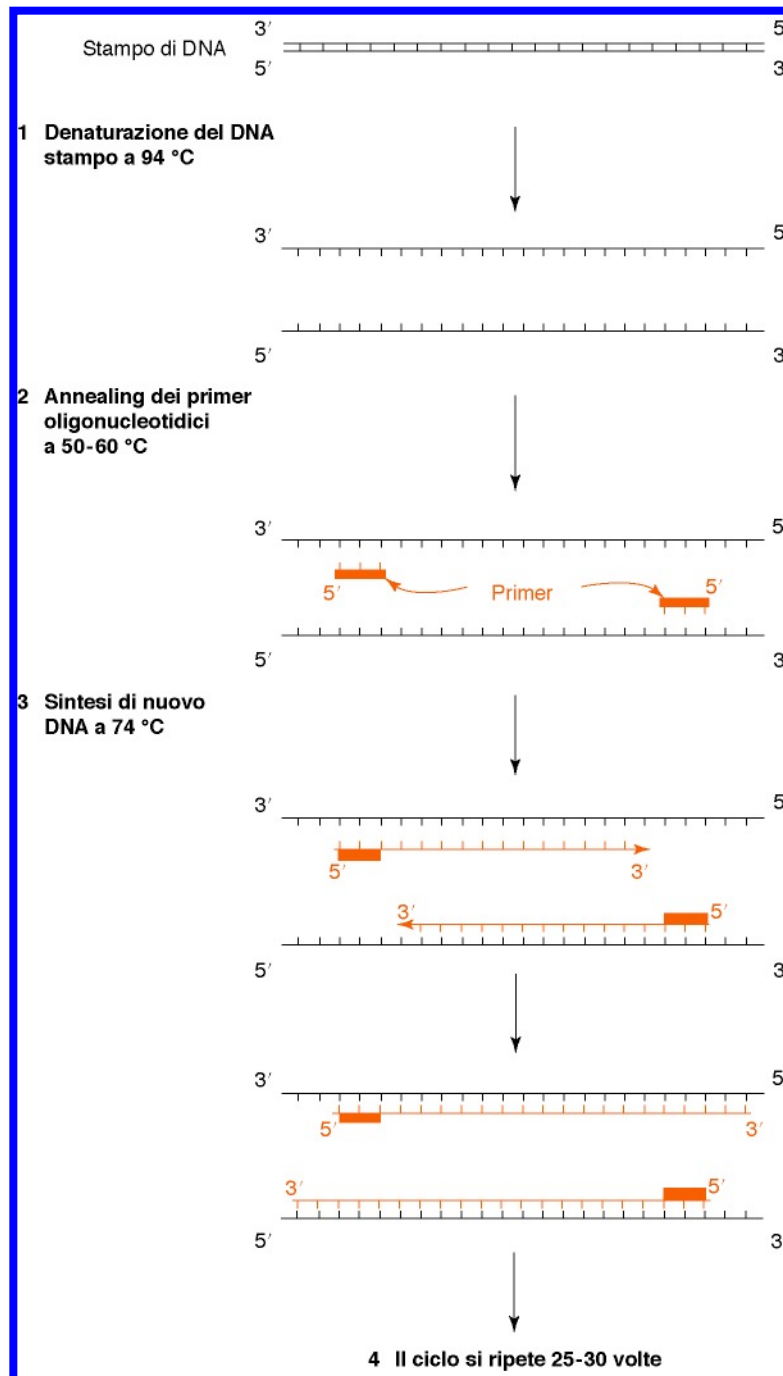


(a) Attacco del DNA alle particelle a scambio ionico

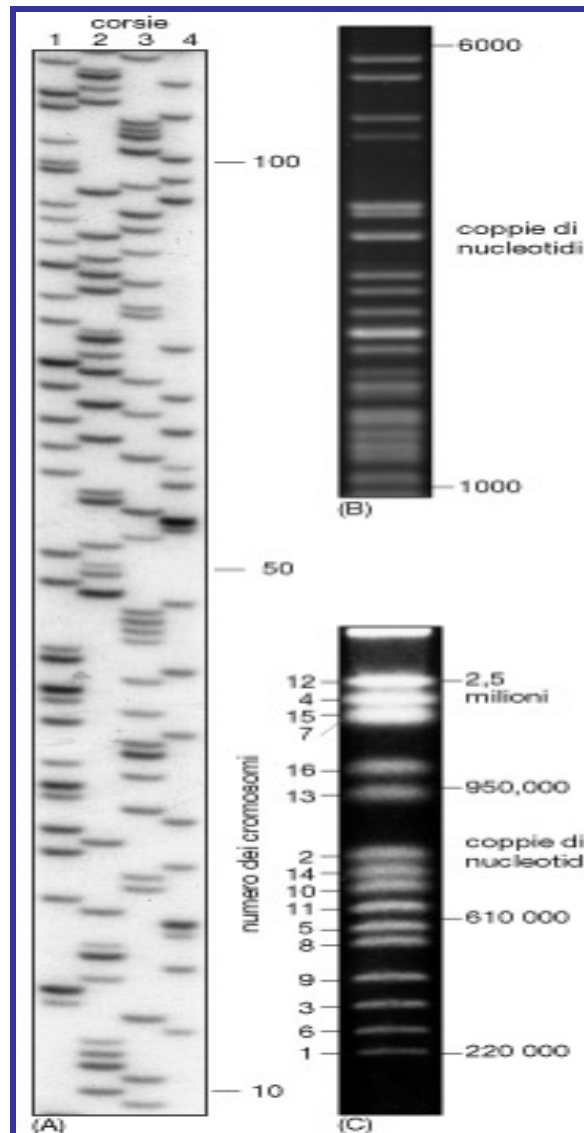
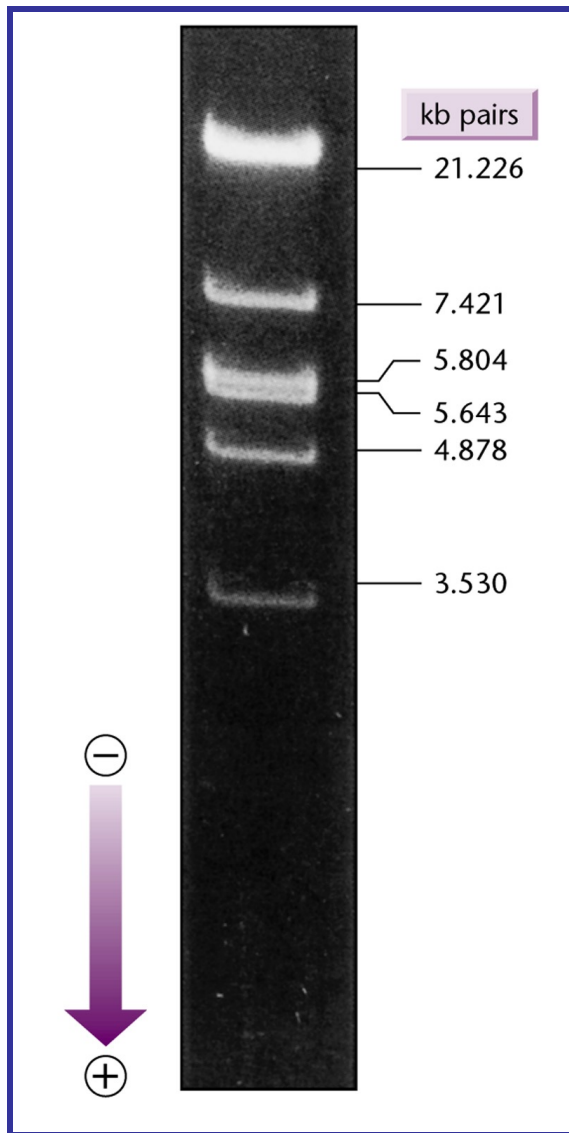


(b) Purificazione del DNA mediante cromatografia a scambio ionico

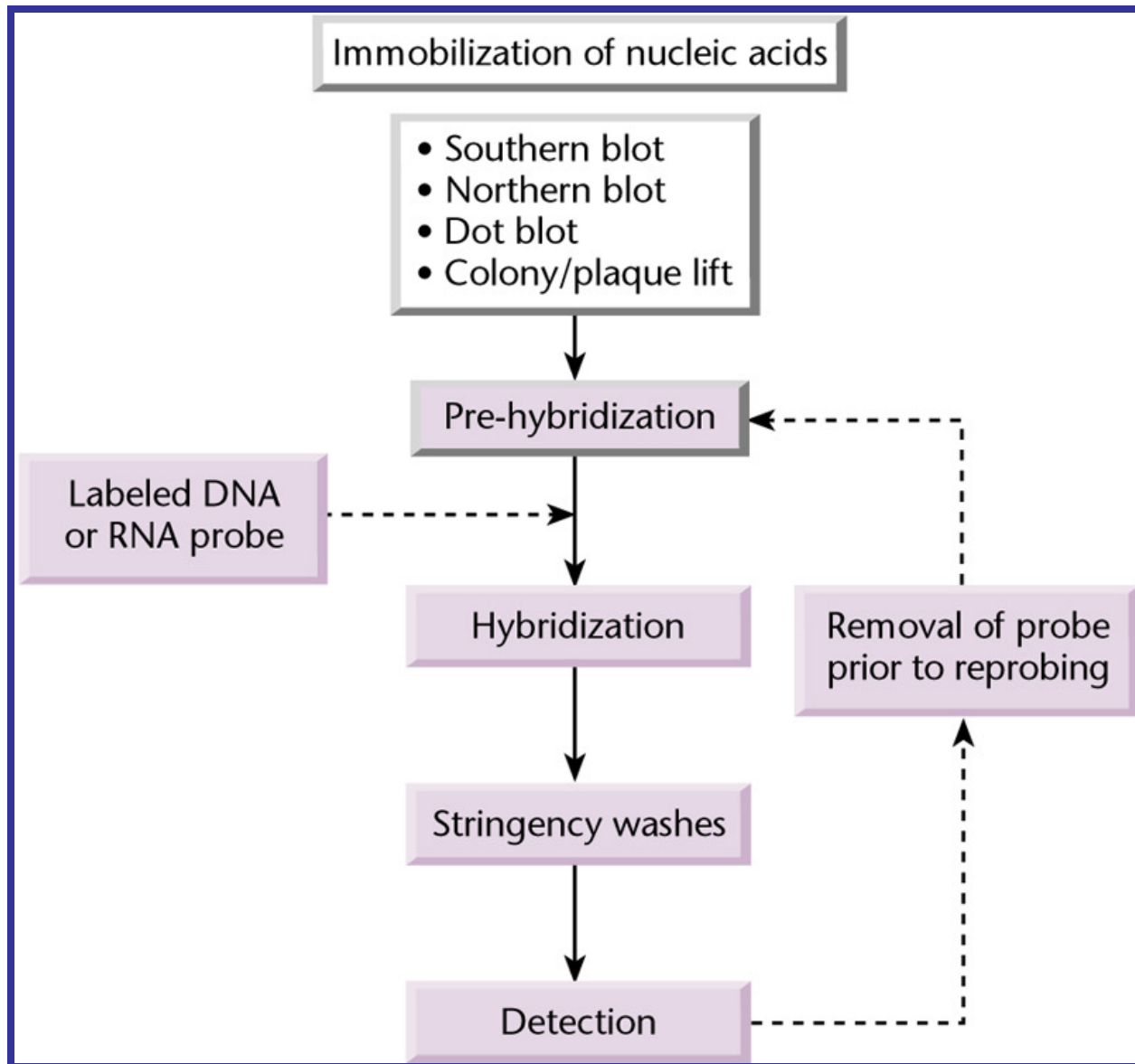




Separazione del DNA



DNA ricombinante: Tecniche di base



DNA ricombinante

- 1) Taglio e frammentazione del DNA
- 2) Enzimi di modificazione
- 3) Strategie di Clonaggio
- 4) Vettori plasmidici e fagici
- 5) Sequenziamento del DNA
- 6) Interazione Proteine-Acidi Nucleici
- 7) MicroArrays, NGS ed approccio genomico

Clonaggio molecolare

DNA Genomico

mRNA

pre-mRNA

Small-RNA

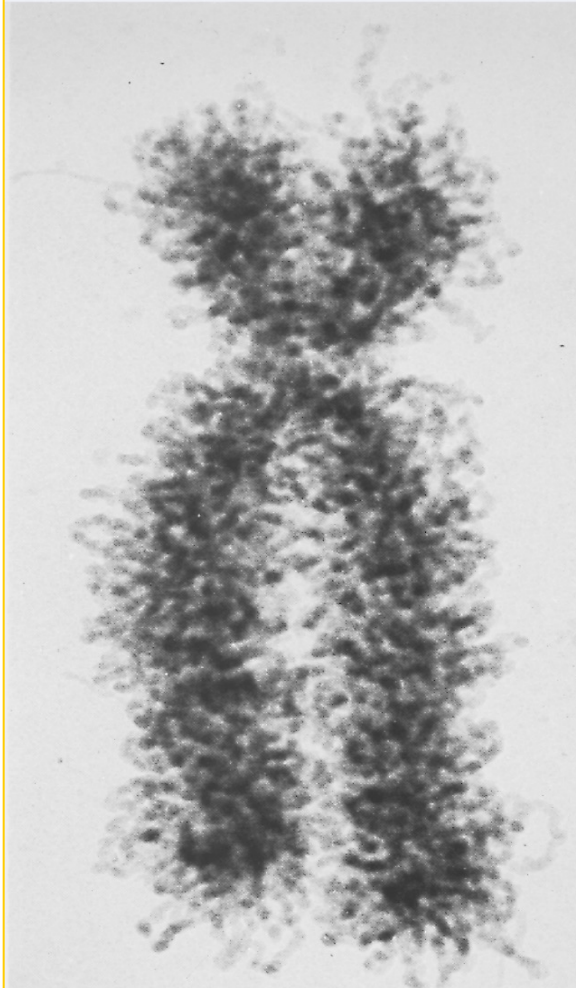
Micro-RNA

Proteina molto abbondante

Proteina poco abbondante

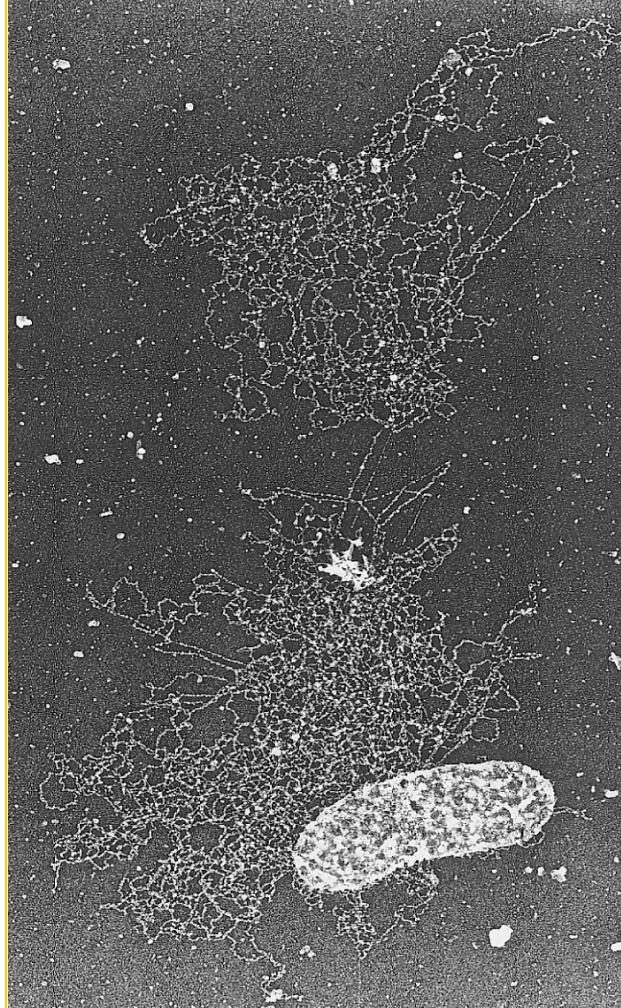
DNA genomico

Figure 18.9 The sister chromatids of a mitotic pair each consist of a fiber (~30 nm in diameter) compactly folded into the chromosome. Photograph kindly provided by E. J. DuPraw.



DNA genomico

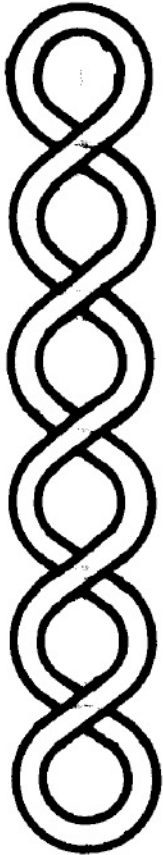
Figure 18.5 The nucleoid spills out of a lysed *E. coli* cell in the form of loops of a fiber. Photograph kindly provided by Jack Griffith.



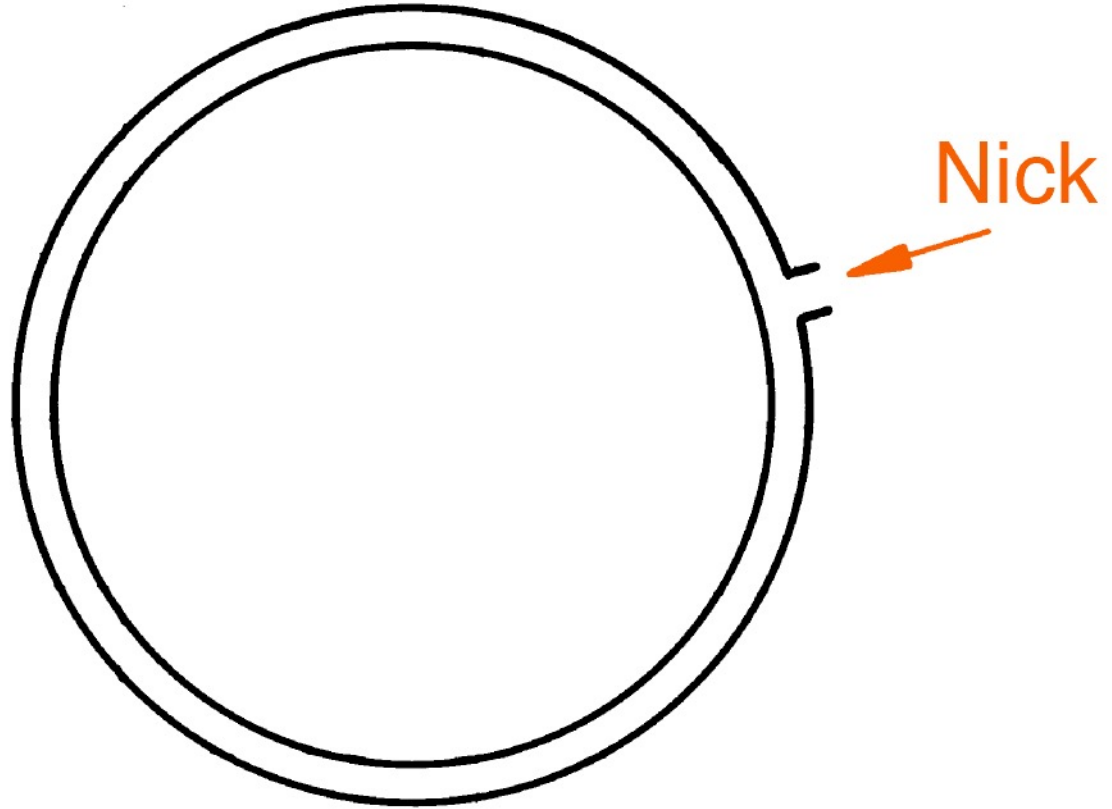
DNA genomico ?



DNA plasmidico

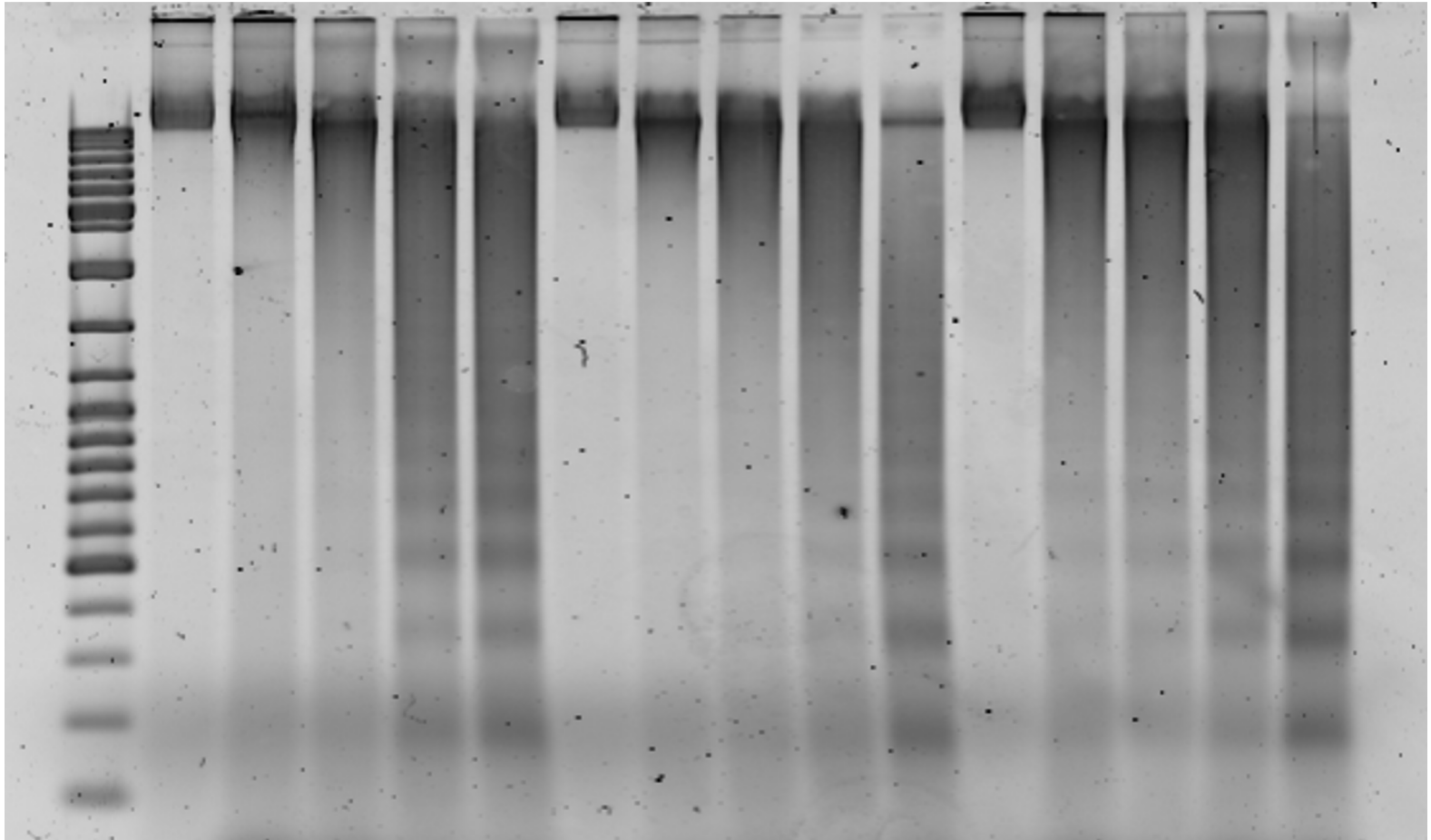


(a) Superavvolto

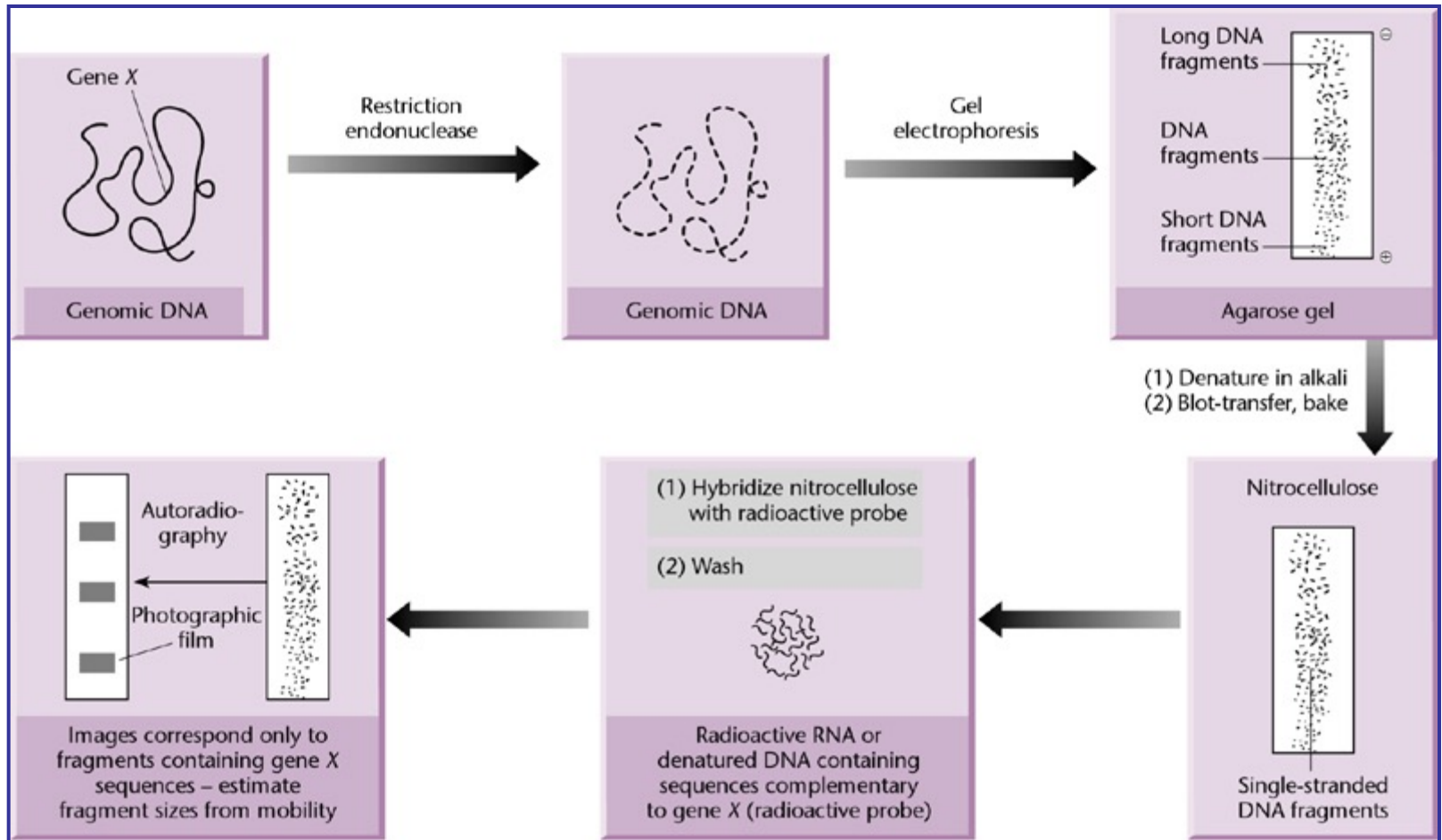


(b) Circolare aperto

DNA genomico



DNA genomico



DNA genomico

Figure 2.17 A zoo blot with a probe from the human Y chromosomal gene *zfy* identifies cross-hybridizing fragments on the sex chromosomes of other mammals and birds. There is one reacting fragment on the Y chromosome and another on the X chromosome. Data kindly provided by David Page.

