

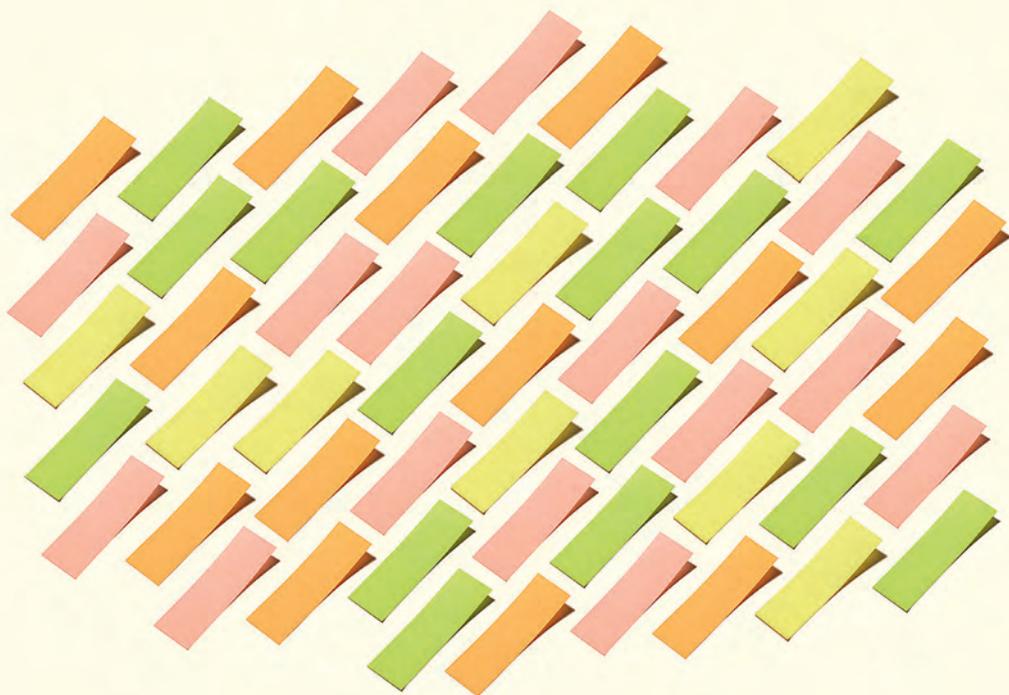
Terry A. Brown

Bioteχνologie molecolari

Principi e tecniche

Terza edizione italiana condotta sull'ottava edizione inglese

A cura di Giovanni Maga



GUARDA!
I VIDEO DEL TUO LIBRO
SULLO SMARTPHONE

BIOLOGIA **ZANICHELLI**

Terry A. Brown

Biotechnologie molecolari

Principi e tecniche

Terza edizione italiana condotta sull'ottava edizione inglese

A cura di Giovanni Maga

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

1. Vai su **my.zanichelli.it**
2. Clicca su *Registrati*.
3. Scegli *Studente*.
4. Segui i passaggi richiesti per la registrazione.
5. Riceverai un'email: clicca sul link per completare la registrazione.
6. Cerca il tuo codice di attivazione stampato in verticale sul bollino argentato in questa pagina.
7. Inseriscilo nella tua area personale su **my.zanichelli.it**

Se sei già registrato, per accedere ai contenuti riservati ti serve solo il codice di attivazione.

INDICE GENERALE

Risorse digitali	XI
Prefazione	XIII

Parte I I principi fondamentali del clonaggio dei geni e dell'analisi del DNA

Capitolo 1

L'importanza del clonaggio dei geni e dell'analisi del DNA	3
1.1 I primi sviluppi della genetica	3
1.2 L'introduzione del clonaggio e della reazione a catena della polimerasi (PCR)	4
1.3 Che cosa si intende per clonaggio di un gene?	4
1.4 Che cos'è la PCR?	6
1.5 Perché il clonaggio genico e la PCR sono importanti	7
1.5.1 Ottenere una preparazione pura di un gene attraverso il clonaggio	7
1.5.2 Anche la PCR può essere usata per isolare un gene	9
1.6 Come orientarsi in questo libro	11
<i>Bibliografia</i>	12

Capitolo 2

I vettori per il clonaggio dei geni: plasmidi e batteriofagi	13
2.1 I plasmidi	13
2.1.1 Dimensione e numero di copie	15
2.1.2 Coniugazione e compatibilità	16
2.1.3 Classificazione dei plasmidi	16
2.1.4 Plasmidi in organismi diversi dai batteri	17
2.2 I batteriofagi	17
2.2.1 Ciclo infettivo dei fagi	18
2.2.2 Fagi lisogeni	19
I geni sul DNA del fago λ sono organizzati in gruppi	20
Il DNA del fago λ può essere lineare o circolare	21
M13, un fago filamentoso	22
2.2.3 Virus come vettori di clonaggio per altri organismi	24
<i>Bibliografia</i>	24

Capitolo 3

La purificazione del DNA dalle cellule	25
3.1 Come isolare il DNA cellulare totale	25
3.1.1 Crescita e raccolta di una coltura di cellule batteriche	26
3.1.2 Preparazione di un estratto cellulare	28
3.1.3 Purificazione del DNA da un estratto cellulare	29
Rimozione dei contaminanti tramite estrazione con solventi organici e digestione enzimatica	29
Utilizzo della cromatografia a scambio ionico per la purificazione del DNA da estratti cellulari	30
Utilizzo del silice per purificare il DNA da estratti cellulari	30
3.1.4 Concentrare il DNA	33
3.1.5 Misurare la concentrazione di DNA	33
3.1.6 Altri metodi per isolare il DNA cellulare totale	34
3.2 Come isolare il DNA plasmidico	36
3.2.1 Separazione sulla base delle dimensioni	36
3.2.2 Separazione in base alla conformazione	37
Denaturazione alcalina	38
Centrifugazione in gradiente di densità con bromuro d'etidio e cesio cloruro	38
3.2.3 Amplificazione dei plasmidi	40
3.3 Come isolare il DNA fagico	41
3.3.1 Allestimento di colture per ottenere titoli elevati di fago λ	41
3.3.2 Preparazione di fagi λ non lisogeni	42
3.3.3 Raccolta dei fagi da una coltura di cellule infette	43
3.3.4 Purificazione del DNA dalle particelle di fago λ	44
3.3.5 La purificazione del DNA di M13 è meno problematica	44
<i>Bibliografia</i>	45

Capitolo 4

La manipolazione del DNA purificato	46
4.1 Gli enzimi per la manipolazione del DNA	47
4.1.1 Nucleasi	47
4.1.2 Ligasi	49
4.1.3 Polimerasi	49
4.1.4 Enzimi che modificano il DNA	51
4.2 Gli enzimi che tagliano il DNA: le endonucleasi di restrizione	51
4.2.1 Scoperta e funzione delle endonucleasi di restrizione	52
4.2.2 Le endonucleasi di restrizione di tipo II tagliano il DNA in corrispondenza di sequenze nucleotidiche specifiche	53

4.2.3	Estremità piatte ed estremità coesive	54	Inattivazione inserzionale del gene <i>ci</i> di λ	85
4.2.4	Determinazione della frequenza delle sequenze bersaglio in una molecola di DNA	55	Selezione tramite fenotipo Spi	86
4.2.5	Eseguire una digestione con enzimi di restrizione in laboratorio	56	Selezione sulla base delle dimensioni del genoma di λ	87
4.2.6	Analisi dei risultati della reazione di taglio da parte di un'endonucleasi di restrizione	58	5.4 L'introduzione di DNA nelle cellule non batteriche	87
	Separazione delle molecole tramite elettroforesi su gel	58	5.4.1 Trasformazione di singole cellule	87
	Visualizzazione delle molecole di DNA all'interno del gel di agarosio	58	5.4.2 Trasformazione di interi organismi	89
4.2.7	Determinazione delle dimensioni delle molecole di DNA	60	<i>Bibliografia</i>	89
4.2.8	Mappatura della posizione dei siti di restrizione lungo la molecola di DNA	60	Capitolo 6	
4.2.9	Tecniche specializzate di elettroforesi su gel per la separazione di grandi molecole di DNA	63	I vettori di clonaggio per <i>Escherichia coli</i>	90
4.3	La ligazione: unire insieme frammenti di DNA	65	6.1 I vettori derivati da plasmidi di <i>E. coli</i>	90
4.3.1	Meccanismo d'azione della DNA ligasi	65	6.1.1 Nomenclatura dei vettori di clonaggio plasmidici	91
4.3.2	Le estremità coesive aumentano l'efficienza della ligazione	65	6.1.2 Proprietà utili di pBR322	91
4.3.3	Come dotare di estremità coesive una molecola di DNA con estremità piatte	66	6.1.3 Pedigree di pBR322	92
	Linker	66	6.1.4 Vettori plasmidici avanzati per <i>E. coli</i>	92
	Adattatori	67	pUC8: vettore con selezione per il fenotipo Lac	93
	Generare estremità coesive mediante code omopolimeriche	70	pGEM3Z: vettore per la trascrizione <i>in vitro</i> del DNA clonato	95
4.3.4	Ligazione di estremità piatte con la DNA topoisomerasi	71	6.2 I vettori derivati dal fago λ	96
<i>Bibliografia</i>		73	6.2.1 Isolamento tramite selezione naturale di fagi λ modificati, privi di specifici siti di restrizione	96
			6.2.2 Si possono rimuovere segmenti del genoma di λ senza compromettere la funzionalità del fago	97
			6.2.3 Vettori di inserzione e di sostituzione	98
			Vettori di inserzione	98
			Vettori di sostituzione	99
			6.2.4 Clonaggio con vettori λ di inserzione e di sostituzione	100
			6.2.5 Lunghi frammenti di DNA possono essere clonati nei cosmidi	101
			6.2.6 Vettori λ e altri vettori a elevata capacità permettono la costruzione di librerie genomiche	102
			6.3 I vettori per la produzione di DNA a singola elica	103
			6.3.1 Vettori basati sul batteriofago M13	103
			6.3.2 Vettori ibridi plasmide-M13	104
			6.4 I vettori per altri batteri	106
			<i>Bibliografia</i>	107
			Capitolo 7	
			I vettori di clonaggio per le cellule eucariote	108
			7.1 I vettori per lieviti e altri funghi	108
			7.1.1 Marcatori di selezione per il plasmide 2 μ m	109
			7.1.2 Vettori derivati dal plasmide 2 μ m: i plasmidi episomici di lievito	110
			7.1.3 Il plasmide YEp può integrarsi nel DNA cromosomico di lievito	110
Capitolo 5				
L'introduzione di DNA nelle cellule viventi		74		
5.1 La trasformazione: la captazione del DNA da parte delle cellule batteriche		76		
5.1.1 Le specie batteriche hanno efficienze differenti nell'incorporare DNA esogeno		76		
5.1.2 Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>		76		
5.1.3 Selezione delle cellule trasformate		77		
5.2 L'identificazione dei ricombinanti		79		
5.2.1 Selezione dei ricombinanti per pBR322 mediante inattivazione inserzionale di un gene di resistenza agli antibiotici		79		
5.2.2 L'inattivazione inserzionale non sempre riguarda la resistenza a un antibiotico		81		
5.3 L'introduzione di DNA fagico nelle cellule batteriche		83		
5.3.1 Trasfezione		83		
5.3.2 Impacchettamento <i>in vitro</i> di vettori di clonaggio basati sul fago λ		83		
5.3.3 L'infezione da parte dei fagi causa la formazione di placche in terreno agar		83		
5.3.4 Identificazione dei fagi ricombinanti		85		
Inattivazione inserzionale del gene <i>lacZ'</i> portato da un vettore fagico		85		

7.1.4	Altri tipi di vettori per il clonaggio in lievito	110
7.1.5	I cromosomi artificiali possono essere utilizzati per clonare lunghi frammenti di DNA in lievito	113
	Struttura e utilizzo di un vettore YAC	114
	Applicazioni dei vettori YAC	115
7.1.6	Vettori per altri lieviti e funghi	115
7.2	I vettori per le piante superiori	116
7.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>, il più piccolo ingegnere genetico naturale	116
	Utilizzo del plasmide Ti per introdurre geni esogeni in una cellula vegetale	117
	Produzione di piante trasformate con il plasmide Ti	119
	Limitazioni del clonaggio con i plasmidi di <i>Agrobacterium</i>	120
7.2.2	Clonaggio di geni in piante per trasferimento genico diretto	121
	Trasferimento genico diretto nel nucleo	121
	Inserimento di geni nel genoma dei cloroplasti	123
7.2.3	Tentativi di utilizzare i virus delle piante come vettori di clonaggio	123
	Vettori basati sui caulimovirus	123
	Vettori basati sui geminivirus	124
7.3	I vettori per gli animali	125
7.3.1	Vettori di clonaggio per gli insetti	125
	Elementi P come vettori di clonaggio per <i>Drosophila</i>	125
	Vettori di clonaggio basati su virus degli insetti	126
7.3.2	Clonaggio nei mammiferi	127
	Virus come vettori di clonaggio per le cellule di mammifero	127
	Clonaggio di geni senza l'utilizzo di vettori	128
	<i>Bibliografia</i>	129

Capitolo 8

	L'isolamento del clone di un singolo gene	131
8.1	Il problema della selezione	131
8.1.1	Sono due le tecniche fondamentali per ottenere il clone di interesse	131
8.2	La selezione diretta	133
8.2.1	Recupero della capacità di sopravvivenza indotto dal marcatore e le applicazioni della selezione diretta	133
8.2.2	Scopi e limiti della tecnica del recupero della sopravvivenza	135
8.3	L'identificazione di un clone all'interno di una genoteca	136
8.3.1	Librerie di geni	136
	Non tutti i geni vengono espressi contemporaneamente	137
	Gli mRNA possono essere clonati sotto forma di DNA complementare	137
8.4	I metodi per identificare un clone	139
8.4.1	I filamenti complementari di acido nucleico danno ibridazione reciproca	139
8.4.2	Analisi con sonda di ibridazione su colonie o placche	140
	Marchatura con tracciante radioattivo	141
	Marchatura non radioattiva	142

8.4.3	Esempi pratici di utilizzo delle sonde di ibridazione	142
	Sonde a elevata frequenza di ibridazione per analizzare una libreria di cDNA	143
	Sonde oligonucleotidiche per geni i cui prodotti proteici sono stati caratterizzati	144
	Le sonde eterologhe permettono l'identificazione di geni simili	147
	L'ibridazione con il metodo di Southern consente di identificare un frammento di restrizione specifico contenente il gene desiderato	147
8.4.4	Metodi di identificazione basati sul rilevamento della presenza del prodotto di traduzione del gene clonato	148
	I metodi di rilevazione immunologica richiedono la presenza di anticorpi	149
	Utilizzo di anticorpi purificati per la rilevazione di una proteina in colonie ricombinanti	149
	Problema dell'espressione genica	150
	<i>Bibliografia</i>	151

Capitolo 9

	La reazione a catena della polimerasi (PCR)	153
9.1	La PCR in breve	153
9.2	La PCR in maggiore dettaglio	156
9.2.1	Progettazione dei primer oligonucleotidici per un esperimento di PCR	156
9.2.2	Determinazione della temperatura corretta da utilizzare	158
9.3	Dopo la PCR: la caratterizzazione dei prodotti di amplificazione	160
9.3.1	Elettroforesi su gel dei prodotti di PCR	160
9.3.2	Clonaggio dei prodotti di PCR	162
9.4	La real time PCR	164
9.4.1	Come si effettua un esperimento di PCR quantitativa	164
9.4.2	Grazie alla real time PCR è possibile quantificare il materiale di partenza	165
9.4.3	Analisi delle curve di denaturazione per identificare la presenza di mutazioni puntiformi	167
	<i>Bibliografia</i>	168

Parte II

Il clonaggio dei geni e l'analisi del DNA nella ricerca scientifica

Capitolo 10

	Il sequenziamento dei geni e dei genomi	171
10.1	Il sequenziamento tramite terminazione della catena di DNA	172
10.1.1	Visione d'insieme del sequenziamento a terminazione di catena	172

10.1.2	Non tutte le DNA polimerasi possono essere utilizzate per il sequenziamento	174
10.1.3	Sequenziamento a terminazione di catena con la DNA polimerasi <i>Taq</i>	175
10.1.4	Limiti del sequenziamento a terminazione di catena	177
10.2	Le tecniche di sequenziamento di nuova generazione	178
10.2.1	Come allestire una libreria per il sequenziamento con il metodo Illumina	179
	Frammentazione del DNA	179
	Immobilizzazione della libreria	180
	Amplificazione della libreria	180
10.2.2	Fase di sequenziamento con il metodo Illumina	181
10.2.3	Sequenziamento a semiconduttori ionici	182
10.2.4	Metodi di sequenziamento di ultima generazione	183
10.2.5	Sequenziamento di nuova generazione senza l'utilizzo di una DNA polimerasi	184
10.2.6	Sequenziamento di geni specifici con le tecniche di nuova generazione	185
10.3	Come si sequenzia un genoma	186
10.3.1	Approccio <i>shotgun</i> per il sequenziamento dei genomi dei procarioti	187
	Sequenziamento <i>shotgun</i> del genoma di <i>Haemophilus influenzae</i>	187
	Sequenziamento <i>shotgun</i> del genoma di altri procarioti	190
10.3.2	Sequenziamento dei genomi degli eucarioti	191
	Sequenziamento tramite <i>shotgun</i> gerarchico	191
	Sequenziamento <i>shotgun</i> di genomi degli eucarioti	194
	Che cosa si intende per "sequenza genomica"?	195
	<i>Bibliografia</i>	196

Capitolo 11

Lo studio dell'espressione e della funzione dei geni		198
11.1	Studiare il trascritto di RNA di un gene	199
11.1.1	Come individuare la presenza di uno specifico trascritto all'interno di una miscela di RNA	199
11.1.2	Mappare i trascritti tramite l'ibridazione di un gene al suo RNA	201
11.1.3	Analisi dei trascritti tramite allungamento di primer	203
11.1.4	Analisi dei trascritti tramite PCR	204
11.2	Studiare la regolazione dell'espressione genica	205
11.2.1	Identificare i siti di legame per proteine su una molecola di DNA	206
	Rallentamento su gel di complessi DNA-proteine	206
	<i>Footprinting</i> con DNasi I	207
	Saggio di interferenza per modificazione	208
11.2.2	Identificare le sequenze di regolazione tramite analisi di delezione	209
	Geni reporter	210
	Come si esegue un'analisi di delezione	212

11.3	Identificare e studiare il prodotto della traduzione di un gene clonato	213
11.3.1	Le tecniche HRT e HART consentono di identificare il prodotto di traduzione di un gene	213
11.3.2	Analisi delle proteine per mutagenesi <i>in vitro</i>	215
	Esistono tipi diversi di mutagenesi <i>in vitro</i>	216
	Introdurre una mutazione puntiforme in un gene clonato usando un oligonucleotide	216
	Altri metodi per generare una mutazione puntiforme in un gene clonato	218
	Potenziati applicazioni della mutagenesi <i>in vitro</i>	219
	<i>Bibliografia</i>	221

Capitolo 12

Lo studio dei genomi		222
12.1	L'identificazione dei geni in una sequenza genomica	223
12.1.1	Identificazione dei geni che codificano le proteine tramite scansione della sequenza genomica	223
	Ricerca delle fasi di lettura aperte	223
	Le scansioni delle ORF sono poco efficaci nel localizzare i geni all'interno dei genomi degli eucarioti	224
12.1.2	Localizzazione dei geni con il supporto della ricerca di omologia	225
12.1.3	Localizzazione di geni esprimenti trascritti di RNA non codificanti	227
12.1.4	Identificazione dei siti di legame per proteine regolatrici in una sequenza genomica	228
12.2	La determinazione della funzione di un gene	229
12.2.1	Attribuzione della funzione a geni tramite approcci sperimentali	229
	Geni specifici possono essere inattivati per ricombinazione omologa	231
	Inattivazione di geni tramite nucleasi programmabili	232
12.3	Gli strumenti di navigazione delle banche dati genomiche	234
	<i>Bibliografia</i>	235

Capitolo 13

Studiare i trascrittomi e i proteomi		236
13.1	Studiare i trascrittomi	236
13.1.1	Studiare i trascrittomi attraverso microarray e chip di DNA	236
13.1.2	Studiare i trascrittomi tramite il sequenziamento dell'RNA	238
	Sequenziare il trascrittoma con la metodica RNA-seq	238
	Studiare il trascrittoma mediante la tecnica SAGE	240
	La tecnica CAGE si basa su principi simili a SAGE, ma è più adatta alle applicazioni di RNA-seq	241

13.2 Studiare i proteomi	243
13.2.1 Come si determina il profilo proteico	243
Separazione delle proteine di un proteoma tramite elettroforesi su gel di poliaccrilammide	243
Separazione delle proteine tramite cromatografia su colonna	244
Come identificare le singole proteine dopo la separazione	245
Paragonare i profili proteici di proteomi differenti	246
13.2.2 Studiare le interazioni tra proteine	247
<i>Phage display</i>	247
Il sistema del doppio ibrido in lievito	249
Array proteici funzionali	249
<i>Bibliografia</i>	251

Parte III

Le applicazioni biotecnologiche del clonaggio e dell'analisi del DNA

Capitolo 14

La produzione di proteine da geni clonati	255
14.1 I vettori specifici per l'espressione di geni eterologhi in <i>E. coli</i>	257
14.1.1 Il promotore è un componente essenziale dei vettori di espressione	259
Il promotore deve essere selezionato con cura	259
Alcuni promotori comunemente utilizzati nei vettori di espressione	261
14.1.2 Cassetto e geni di fusione	262
14.2 I problemi comuni nella produzione di proteine ricombinanti in <i>E. coli</i>	265
14.2.1 Problemi dovuti alla sequenza del gene esogeno	265
14.2.2 Problemi dovuti all'utilizzo di <i>E. coli</i> come ospite	267
14.3 La produzione di proteine ricombinanti nelle cellule eucariote	268
14.3.1 Espressione di proteine ricombinanti in lieviti e funghi filamentosi	268
Lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> come ospite per l'espressione di proteine ricombinanti	268
Altri lieviti e funghi	269
14.3.2 Utilizzo di cellule animali per la produzione di proteine ricombinanti	270
Produzione di proteine in cellule di mammifero	270
Produzione di proteine in cellule di insetto	271
14.3.3 <i>Pharming</i>: produzione di proteine ricombinanti da animali e piante	272
<i>Pharming</i> e animali	272
Produzione di proteine ricombinanti in piante	273
Considerazioni etiche relative al <i>pharming</i>	274
<i>Bibliografia</i>	275

Capitolo 15

Il clonaggio e l'analisi del DNA in medicina	277
15.1 La produzione di principi farmaceutici con la tecnologia del DNA ricombinante	277
15.1.1 Produzione di insulina ricombinante	277
Sintesi ed espressione di geni artificiali per l'insulina	279
15.1.2 Sintesi di ormoni della crescita umani in <i>E. coli</i>	279
15.1.3 Produzione di fattore VIII ricombinante	282
15.1.4 Sintesi di altre proteine ricombinanti umane	283
15.1.5 Vaccini ricombinanti	283
Produzione di vaccini con proteine ricombinanti	284
Vaccini ricombinanti da piante transgeniche	286
Vaccini vivi ricombinanti	288
15.2 L'identificazione di geni responsabili di patologie umane	289
15.2.1 Come identificare il gene responsabile di una malattia genetica	290
Localizzare la posizione approssimativa del gene all'interno del genoma umano	291
Analisi di associazione per il gene umano <i>BRCA1</i>	292
Identificazione dei candidati per il gene-malattia	294
15.2.2 Genotipizzazione di mutazioni malattia	295
15.3 La terapia genica	297
15.3.1 Terapia genica per le malattie ereditarie	297
15.3.2 Terapia genica e cancro	298
15.3.3 Aspetti etici della terapia genica	300
<i>Bibliografia</i>	301

Capitolo 16

Il clonaggio e l'analisi del DNA in agricoltura	303
16.1 Il trasferimento genico per la manipolazione genetica delle piante	304
16.1.1 Piante che producono i propri pesticidi	304
δ -Endotossine di <i>Bacillus thuringiensis</i>	304
Clonaggio del gene della δ -endotossina nel mais	305
Clonaggio del gene della δ -endotossina nei cloroplasti	307
Problema della resistenza degli insetti alle coltivazioni esprimenti δ -endotossine	308
16.1.2 Coltivazioni resistenti agli erbicidi	310
Coltivazioni "Roundup Ready"	310
Coltivazioni resistenti al glifosato di nuova generazione	311
16.1.3 Come aumentare il valore nutrizionale delle piante attraverso trasferimento genico	312
16.1.4 Altri programmi di trasferimento genico	313
16.2 La sottrazione genica	315
16.2.1 Tecnologia degli RNA antisense per modificare la maturazione dei pomodori	315
Utilizzo degli RNA antisense per l'inattivazione del gene della poligalatturonasi	315

	Utilizzo degli RNA antisenso per l'inattivazione della sintesi di etilene	317
16.2.2	Altri esempi di utilizzo degli RNA antisenso nell'ingegneria genetica vegetale	318
16.3	L'editing genomico tramite nucleasi programmabili	319
16.3.1	Editing genomico della fitoene desaturasi del riso	319
16.3.2	Editing di più geni in una singola pianta	321
16.3.3	Sviluppi futuri dell'editing genomico in campo agricolo	322
16.4	Le piante GM sono pericolose per la salute umana e per l'ambiente?	324
16.4.1	Preoccupazioni riguardo alla sicurezza dell'uso dei marcatori di selezione	324
16.4.2	Possibili effetti dannosi sull'ambiente	325
	<i>Bibliografia</i>	326

Capitolo 17

	Il clonaggio e l'analisi del DNA nelle scienze forensi e in archeologia	328
17.1	L'analisi del DNA per identificare chi ha commesso un crimine	328
17.1.1	Determinazione dell'impronta genetica tramite ibridazione con sonda	329
17.1.2	Ottenimento del profilo di DNA con l'analisi tramite PCR delle corte ripetizioni in tandem	330
17.2	Lo studio delle parentele attraverso l'analisi dei profili di DNA	332
17.2.1	Individui imparentati hanno profili di DNA simili	332

17.2.2	Analisi del profilo di DNA effettuata sulle spoglie della famiglia Romanov	332
	Analisi delle STR partendo dalle ossa dei Romanov	332
	L'analisi del DNA mitocondriale è stata usata per collegare i resti dei Romanov alla loro discendenza vivente	334
	Il caso dei figli mancanti	335
17.3	La determinazione del sesso tramite l'analisi del DNA	335
17.3.1	Analisi di PCR per sequenze specifiche del cromosoma Y	335
17.3.2	PCR per il gene dell'amelogenina	336
17.4	L'archeogenetica: utilizzare il DNA per studiare la preistoria dell'umanità	337
17.4.1	Origine dell'essere umano moderno	338
	L'analisi del DNA ha messo in discussione l'ipotesi multiregionale	338
	L'analisi del DNA ha mostrato che i Neanderthal non sono gli antenati diretti delle popolazioni europee moderne	339
	La sequenza del genoma dei Neanderthal suggerisce un incrocio genetico con <i>H. sapiens</i>	340
17.4.2	Il DNA può essere utilizzato anche per studiare le migrazioni della specie umana	342
	L'essere umano moderno potrebbe essere migrato dall'Etiopia alla penisola arabica	342
	Colonizzazione del Nuovo Mondo	344
	<i>Bibliografia</i>	346
	Glossario	349
	Indice analitico	362

PREFAZIONE

Da quando è stata pubblicata la precedente edizione di *Bioteχνologie molecolari*, la novità principale nell'ambito delle tecnologie del DNA è stata una maggior diffusione dell'editing genetico come strumento per la ricerca di base e per le applicazioni biotecnologiche.

La metodologia di base dell'editing con CRISPR è ora descritta nel Capitolo 12, mentre le sue applicazioni sono esplorate nel Capitolo 16, nel contesto dell'ingegneria vegetale. La continua evoluzione delle tecniche di sequenziamento del DNA di nuova generazione si rispecchia nella riorganizzazione dei contenuti del Capitolo 10; per affrontare l'enorme proliferazione di metodi per studiare i trascrittomi e i proteomi (che sono stati approfonditi nonostante non riguardino strettamente l'analisi del DNA), ho creato un nuovo capitolo dedicato a questi metodi, il 13. Tra le novità, segnalo anche un nuovo paragrafo sull'analisi delle curve di denaturazione dei prodotti della real time PCR e sull'identificazione genetica delle mutazioni coinvolte nelle malattie umane.

Ho scritto la prima edizione di questo libro nel 1985, poco dopo aver avuto il mio primo incarico accademico. Ricordo con orgoglio quel piccolo libro, con la copertina gialla, anche se non ne ho più una copia e non sono stato nemmeno in grado di recuperarne una. Ho scritto quest'ultima edizione durante i mesi immediatamente successivi al mio pensionamento. Voglio ringraziare tutti i colleghi, le colleghe, gli studenti, le studentesse e le persone che mi hanno scritto per email durante questi 35 anni, mandandomi commenti e suggerimenti sul contenuto del libro e il modo in cui gli argomenti sono presentati. In particolare, voglio ringraziare Mehdi Evazalipour della Guilan Medical University e Salman Odooli della University of Isfahan per avermi segnalato un paio di errori di lunga data presenti nelle precedenti edizioni.

Infine, attraverso i 35 anni di questo libro, il vero punto fermo è stata la presenza di Keri, mia compagna di vita e collega di laboratorio, che mi ha costantemente sostenuto e incoraggiato nella mia avventura di scrittore.

Terry A. Brown
University of Manchester

L'importanza del clonaggio dei geni e dell'analisi del DNA

Sommario

- 1.1 I primi sviluppi della genetica
- 1.2 L'introduzione del clonaggio e della reazione a catena della polimerasi (PCR)
- 1.3 Che cosa si intende per clonaggio di un gene?
- 1.4 Che cos'è la PCR?
- 1.5 Perché il clonaggio genico e la PCR sono importanti
- 1.6 Come orientarsi in questo libro

A metà del diciannovesimo secolo, Gregor Mendel formulò una serie di leggi per spiegare l'ereditarietà dei caratteri biologici. L'ipotesi di fondo di queste leggi è che una particella fisica, chiamata **gene** e presente in qualche compartimento della cellula, controlli ogni caratteristica ereditabile di un organismo vivente. Le leggi di Mendel vennero riscoperte all'inizio del ventesimo secolo, segnando la nascita della **genetica**, ossia la branca della scienza che si pone l'obiettivo di comprendere che cosa siano i geni e come funzionino esattamente.

1.1 I primi sviluppi della genetica

Questa nuova disciplina scientifica si sviluppò con una velocità straordinaria nei primi 30 anni della sua esistenza. L'idea che i geni si trovino sui **cromosomi** venne proposta da W. Sutton nel 1903 e trovò conferma sperimentale grazie agli studi di T. H. Morgan nel 1910. Successivamente, Morgan e colleghi svilupparono le tecniche di **mappatura genica**, grazie alle quali nel 1922 generarono un'analisi completa della posizione relativa di oltre 2000 geni sui quattro cromosomi del moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*.

Tuttavia, nonostante questi brillanti studi, la natura molecolare dei geni non venne realmente compresa fino a dopo il 1940. Infatti, fu solo dopo gli esperimenti realizzati da Avery, MacLeod e McCarty nel 1944 e poi da Hershey e Chase nel 1952, che l'idea che il materiale genetico fosse costituito dall'acido deossiribonucleico (DNA) venne accettata da tutti. Fino a quel momento, era opinione condivisa che i geni fossero di natura proteica. La scoperta del ruolo del DNA diede un grandissimo impulso agli studi di genetica, e molti biologi famosi (tra i più influenti Delbrück, Chargaff, Crick e

Monod) contribuirono alla seconda grande era della genetica. Nei 14 anni compresi tra il 1952 e il 1966 venne risolta la struttura del DNA, decifrato il codice genetico e furono descritti i processi della trascrizione e della traduzione.

1.2 L'introduzione del clonaggio e della reazione a catena della polimerasi (PCR)

Questi anni di grande attività e scoperte furono seguiti da una pausa, un periodo di stasi in cui molti biologi molecolari (come i genetisti di nuova generazione amavano definirsi) ritenevano che ci fosse ormai poco di veramente importante ancora da scoprire. In realtà, nel settore regnava un clima di frustrazione, a causa dell'inadeguatezza delle tecniche sperimentali a disposizione alla fine degli anni '60, che non consentivano lo studio dei geni in maggiore dettaglio.

Negli anni 1971-1973 la ricerca genetica acquistò nuovo slancio grazie a quella che venne definita una vera e propria rivoluzione della biologia. Lo sviluppo di metodologie interamente nuove rese possibile ideare e realizzare – se non con facilità certamente con successo – esperimenti fino ad allora ritenuti impossibili. L'insieme di queste tecniche, conosciuto come **tecnologia del DNA ricombinante** o **ingegneria genetica**, si basava sul procedimento del **clonaggio genico** e diede inizio a una nuova grande fase della ricerca genetica. Queste metodologie resero possibile lo sviluppo di procedimenti rapidi ed efficienti per il **sequenziamento del DNA**, che a sua volta consentì di determinare la struttura dei singoli geni, culminando, alla fine del secolo scorso, nei progetti di sequenziamento su larga scala, come quello del genoma umano, completato nel 2000. Inoltre, queste tecniche consentirono lo sviluppo di metodologie per lo studio della regolazione dei singoli geni, permettendo ai biologi molecolari di comprendere come alterazioni nell'attività di alcuni geni possano causare patologie umane come il cancro. Infine, queste tecniche consentirono la nascita delle moderne **biotecnologie**, che utilizzano i geni per la produzione di proteine e altri composti utili per applicazioni mediche e industriali.

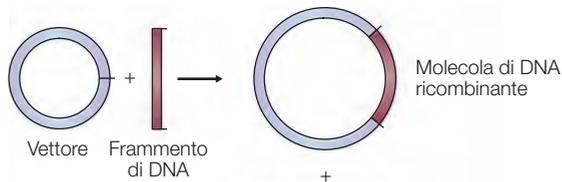
Negli anni '80, quando l'eccitazione scatenata dalle rivoluzionarie applicazioni del clonaggio genico era al suo culmine, sembrava impossibile che un'altra scoperta, altrettanto nuova e rivoluzionaria, fosse dietro l'angolo. Si narra che Kary Mullis abbia immaginato la **reazione a catena della polimerasi (PCR)** guidando da Berkley a Mendocino, lungo la statale 128 della California, un venerdì sera del 1983. La sua intuizione ha permesso di sviluppare una tecnica semplice ed elegante, in grado di fungere da perfetto complemento per il clonaggio. La PCR, infatti, ha reso più semplici molte tecniche di clonaggio che erano già in uso, ma che fino ad allora erano di complessa esecuzione, estendendo la portata dell'analisi del DNA e consentendo così alla biologia molecolare di sviluppare nuove applicazioni, anche al di fuori dei suoi tipici ambiti di studio, quali la medicina, l'agricoltura e le biotecnologie. L'archeogenetica, l'ecologia molecolare e la genetica forense sono solo tre esempi di discipline nate come conseguenza diretta dell'invenzione della PCR, consentendo ai biologi molecolari di investigare l'evoluzione della specie umana, l'impatto dei cambiamenti ambientali sulla biosfera e di porre i propri potenti strumenti di indagine al servizio della lotta contro il crimine. Sono trascorsi 50 anni dall'inizio dell'era del clonaggio dei geni, ma stiamo ancora cavalcando l'onda dell'entusiasmo e non se ne vede la fine.

1.3 Che cosa si intende per clonaggio di un gene?

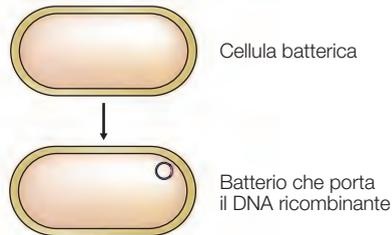
Che cosa significa esattamente clonare un gene? Il modo migliore per rispondere a questa domanda è seguire passo per passo un esperimento di clonaggio (**Figura 1.1**).

- 1 Un frammento di DNA, contenente il gene da clonare, viene inserito in una molecola di DNA circolare detta **vettore**, generando un **DNA ricombinante**.
- 2 Il vettore serve a trasportare il gene all'interno di una cellula ospite, che generalmente è una cellula batterica, anche se si possono utilizzare altri tipi cellulari.
- 3 All'interno della cellula ospite il vettore si moltiplica producendo molte copie identiche, non solo di se stesso, ma anche del gene in esso contenuto.
- 4 Quando la cellula ospite si divide, le copie del vettore vengono distribuite tra le cellule figlie, al cui interno il vettore si replica producendo altre copie.
- 5 Dopo numerose divisioni cellulari, si genera una colonia, o **clone**, di cellule identiche. Ogni cellula del clone contiene una o più copie del DNA ricombinante. Quindi, a questo punto, si dice che il gene portato dal vettore all'interno della molecola di DNA ricombinante è stato clonato.

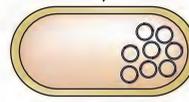
1 Generazione di una molecola di DNA ricombinante



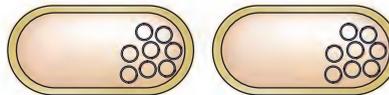
2 Trasporto all'interno della cellula ospite



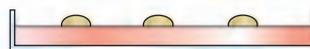
3 Moltiplicazione della molecola di DNA ricombinante



4 Divisione della cellula ospite



5 Numerose divisioni cellulari danno origine a un clone



Colonie batteriche cresciute su mezzo di coltura solido

Figura 1.1
I passaggi principali del clonaggio di un gene.

1.4 Che cos'è la PCR?

La reazione a catena della polimerasi è molto diversa dal clonaggio genico. Anziché tramite la manipolazione di cellule vive, la PCR viene realizzata in provetta, semplicemente miscelando il DNA con appositi reagenti e inserendo la provetta in un termociclatore, un'apparecchiatura che consente di incubare la miscela a temperature variabili in maniera programmata. I passaggi principali di una reazione di PCR sono quattro (Figura 1.2).

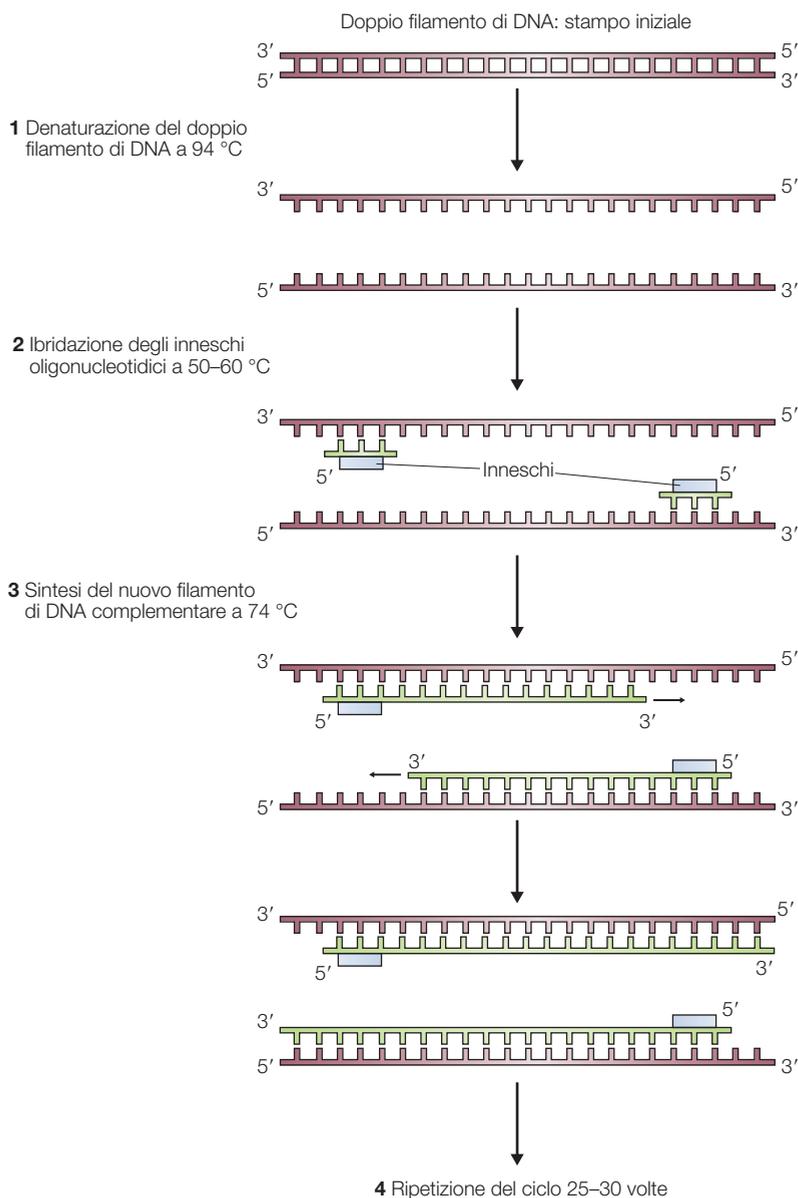


Figura 1.2

I passaggi principali della reazione a catena della polimerasi (PCR).

- 1 La miscela è scaldata a 94 °C, temperatura alla quale i legami idrogeno tra le basi, che tengono uniti i due filamenti della doppia elica, si rompono, causando la **denaturazione** del DNA.
- 2 La miscela è successivamente raffreddata a 50–60 °C. A questa temperatura i due filamenti di ogni molecola di DNA sono in grado di rinaturarsi e ricostituire la doppia elica, ma ciò non avviene perché la miscela contiene un ampio eccesso molare di frammenti di DNA corti, detti **oligonucleotidi** o **inneschi (primer)**, che si **ibridano** a specifiche porzioni complementari sulla molecola di DNA.
- 3 La temperatura è innalzata a 74 °C. Questa è la temperatura ideale di lavoro per la **DNA polimerasi Taq** contenuta nella miscela. Studieremo le **DNA polimerasi** in maggiore dettaglio nel Paragrafo 4.1.3; tutto ciò che ci serve sapere adesso è che, in questo passaggio della PCR, la DNA polimerasi *Taq* si lega all'estremità di ciascun innesco e sintetizza l'elica di DNA complementare al filamento di DNA **stampo**. A questo punto, nella provetta ci sono quattro filamenti di DNA, invece che i due presenti nella miscela di partenza.
- 4 La temperatura viene nuovamente innalzata a 94 °C. Le molecole di DNA a doppia elica, ciascuna delle quali contiene un filamento della molecola originale e un filamento neosintetizzato, vengono denaturate a singola elica. Inizia così un nuovo ciclo di denaturazione-ibridazione-sintesi, alla fine del quale ci saranno otto filamenti di DNA. Ripetendo il ciclo 30 volte, la molecola a doppio filamento di partenza è convertita in oltre 1 miliardo di nuove molecole a doppia elica, ciascuna delle quali è una copia della regione della molecola di partenza, definita dai siti di ibridazione dei due inneschi.

1.5 Perché il clonaggio genico e la PCR sono importanti

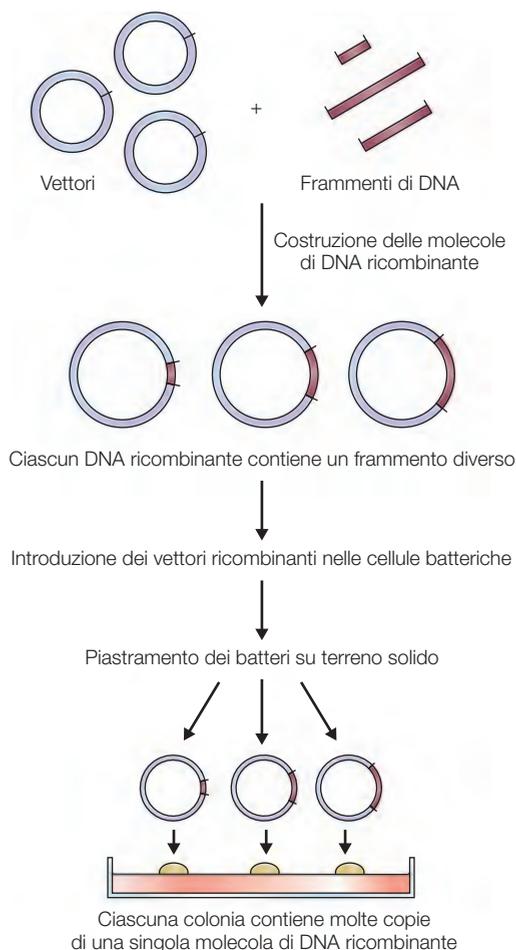
Come è evidente osservando le Figure 1.1 e 1.2, il clonaggio genico e la PCR sono procedure relativamente semplici. Come mai, allora, hanno assunto una così grande importanza in biologia? La ragione risiede soprattutto nella loro capacità di fornire un campione puro di un singolo gene, separato da tutti gli altri geni della cellula.

1.5.1 Ottenere una preparazione pura di un gene attraverso il clonaggio

Per capire esattamente come il clonaggio possa fornire un campione puro di un singolo gene, torniamo all'esperimento illustrato nella Figura 1.1, ma questa volta rappresentiamolo in modo leggermente diverso (**Figura 1.3**). In questo esempio, il frammento di DNA da clonare è all'interno di una miscela di molti frammenti diversi, ciascuno contenente un gene differente o parte di un gene (la miscela potrebbe contenere l'intero complemento dei geni di un organismo, anche quello di un essere umano). Ciascun frammento viene inserito in una molecola diversa di DNA vettore, in modo da generare una miscela di molecole di DNA ricombinante, delle quali una sola contiene il gene di interesse.

Di norma ogni cellula ospite riceve una sola molecola di vettore, così che, sebbene l'insieme di tutti i cloni ottenuti alla fine dell'esperimento possa contenere molecole di DNA ricombinante diverse, ogni singolo clone contiene molte copie di una sola molecola di vettore. In questo modo, il gene di interesse è separato da tutti gli altri geni presenti nella miscela originale e le sue proprietà possono essere studiate in dettaglio.

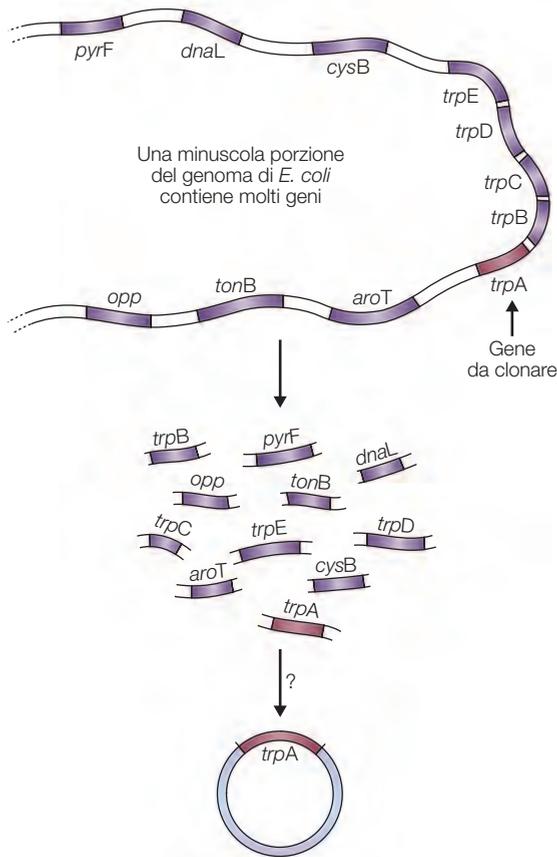
In pratica, la chiave del successo di un esperimento di clonaggio è la capacità di identificare il clone di interesse tra i molti cloni differenti che sono stati ottenuti. Se pensiamo, per esempio, al **genoma** del batterio *Escherichia coli*, che contiene più di 4000 geni diversi, riuscire a isolare un singolo gene

**Figura 1.3**

Il clonaggio permette di isolare frammenti specifici di DNA.

tra tutti i possibili cloni potrebbe sembrare un'impresa impossibile (**Figura 1.4**); il problema appare ancora più insuperabile se ci ricordiamo che i batteri sono organismi relativamente semplici e che il genoma umano contiene circa cinque volte più geni di *Escherichia coli*. Come vedremo nel Capitolo 8, abbiamo a disposizione una serie diversificata di tecniche che ci assicurano che solo il gene desiderato venga isolato alla fine del clonaggio. Alcune di queste tecniche si basano su variazioni della procedura di clonaggio che rendono capaci di dividersi solo le cellule che hanno incorporato il gene desiderato, in modo che il clone di interesse sia automaticamente **selezionato**. Altri metodi utilizzano tecniche che consentono di identificare il clone desiderato all'interno di una miscela di molti cloni differenti.

Una volta che un gene è stato clonato, abbiamo a disposizione una fonte di informazioni pressoché illimitata riguardo alla sua struttura ed espressione. La disponibilità di materiale clonato ha stimolato lo sviluppo di molte metodologie analitiche per lo studio dei geni e nuove tecniche vengono continuamente messe a punto. I metodi per lo studio della struttura e dell'espressione di un gene clonato sono illustrati, rispettivamente, nei Capitoli 10 e 11.



Come possiamo selezionare o identificare un gene specifico tra i tanti presenti?

Figura 1.4
Il problema della selezione.

1.5.2 Anche la PCR può essere usata per isolare un gene

Anche la reazione a catena della polimerasi può essere usata per ottenere una preparazione pura di un gene. Ciò è possibile perché la regione della molecola di DNA di partenza, che viene copiata durante la reazione di PCR, è rappresentata dal segmento i cui confini sono identificati dalle posizioni a cui si ibridano i due oligonucleotidi che fungono da inneschi. Se gli inneschi si ibridano a entrambe le estremità del gene di interesse, si generano molte copie di quel gene specifico (Figura 1.5). Il risultato finale è lo stesso di un esperimento di clonaggio, ma qui non c'è il problema della selezione, perché il gene desiderato è automaticamente "selezionato" sulla base della posizione a cui si ibridano gli inneschi.

Un esperimento di PCR richiede poche ore, mentre per ottenere un gene attraverso il clonaggio ci vogliono settimane (se non mesi). Perché allora si utilizzano ancora le tecniche di clonaggio dei geni? Principalmente perché la PCR ha due limitazioni:

- affinché gli inneschi si ibridino alle posizioni corrette è necessario conoscere la sequenza dei siti di ibridazione su entrambi i lati del gene di interesse. Sintetizzare un innesco con la sequenza desiderata è facile (► Figura 8.15), ma se la sequenza voluta non è nota, allora non è possibile generare gli

inneschi. Ciò significa che la PCR non può essere usata per isolare geni che non siano stati studiati in precedenza, per i quali si deve quindi utilizzare il clonaggio;

- c'è un limite alla lunghezza della sequenza di DNA che può essere copiata in una reazione di PCR. Si possono copiare facilmente 5 kilobasi (kbp) e con speciali accorgimenti è possibile arrivare a copiare frammenti lunghi fino a 40 kbp, ma queste dimensioni sono inferiori alla lunghezza di molti geni, specialmente quelli umani e di altri vertebrati. Per ottenere una versione completa di un gene lungo è necessario utilizzare il clonaggio.

Il clonaggio è quindi l'unico metodo per isolare geni lunghi o che non sono mai stati studiati prima, ma la PCR trova comunque molte applicazioni importanti. Per esempio, anche se la sequenza del gene desiderato non è nota, è ancora possibile determinare la sequenza appropriata per la coppia di inneschi, basandosi sulla conoscenza delle sequenze di geni equivalenti in altri organismi. Un gene che sia stato isolato e sequenziato nel topo, per esempio, può essere utilizzato per progettare una coppia di inneschi per l'isolamento del gene umano equivalente.

Inoltre, ci sono molte applicazioni in cui è richiesto l'isolamento o l'identificazione di geni le cui sequenze sono note. Per esempio, la PCR per i geni della globina umana viene utilizzata come test per rivelare la presenza di mutazioni che potrebbero causare la malattia del sangue chiamata *talassemia*. Gli inneschi appropriati per la reazione di PCR sono facili da generare, dato che le sequenze dei geni per la globina umana sono note. Dopo la PCR, le copie dei geni vengono sequenziate o analizzate in altro modo, al fine di stabilire se contengono le mutazioni per la talassemia.

Un'altra applicazione clinica della PCR prevede l'utilizzo di inneschi specifici per il DNA di un virus patogeno. Un risultato positivo indica che il campione analizzato contiene il virus e la persona da cui il campione deriva dev'essere sottoposta a terapia per prevenire lo sviluppo della patologia.

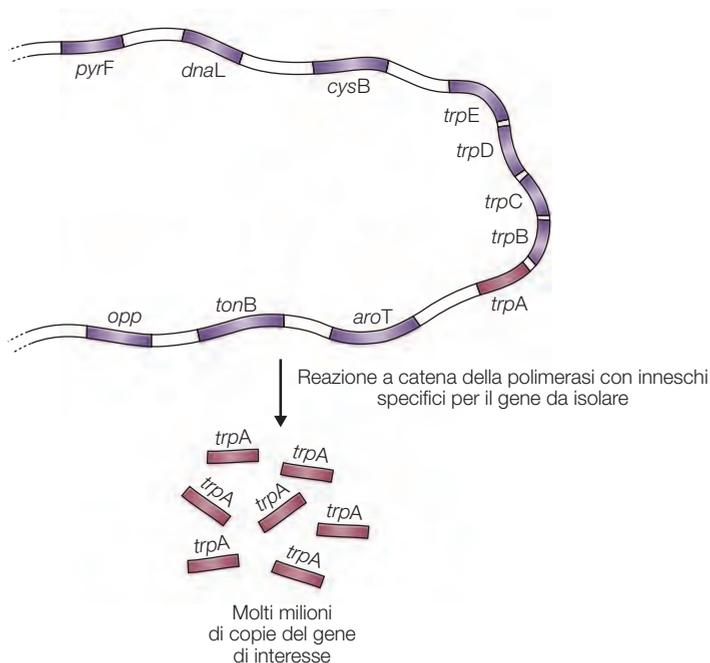


Figura 1.5
L'isolamento di un gene con la PCR.

La PCR è estremamente sensibile e una reazione allestita in modo appropriato è in grado di generare quantità di DNA misurabili, anche se nella miscela di partenza è presente una sola molecola del DNA da amplificare. Ciò significa che questa tecnica può rilevare la presenza di un virus agli stadi più precoci dell'infezione, aumentando le probabilità di successo terapeutico. Inoltre, la sua elevata sensibilità fa sì che la PCR possa essere utilizzata in ambito forense per rilevare la presenza di DNA a partire da materiali come capelli e sangue essiccato, e persino ossa di esseri umani morti molto tempo fa (► Capitolo 17).

1.6 Come orientarsi in questo libro

Questo libro spiega come si eseguono il clonaggio dei geni, la PCR e altre tecniche di analisi del DNA, e illustra le applicazioni di queste metodiche nella biologia moderna. Le ricadute applicative sono descritte nella seconda e terza parte del libro: la parte II spiega come vengono studiati i geni e i genomi, mentre la parte III fornisce una panoramica sulle applicazioni del clonaggio e della PCR nelle biotecnologie, in campo medico, in agricoltura e nella pratica forense.

Nella parte I presentiamo i principi fondamentali. La maggior parte dei nove capitoli della parte I è dedicata al clonaggio, poiché più complesso della PCR. Una volta capito il procedimento di clonaggio, avrete anche compreso molti dei principi alla base dell'analisi del DNA. Nel Capitolo 2, la nostra attenzione sarà rivolta alla componente centrale di ogni esperimento di clonaggio: il vettore che trasporta il gene alla cellula ospite e che è responsabile della sua replicazione. Per fungere da vettore di clonaggio, una molecola di DNA dev'essere in grado di penetrare nella cellula ospite e, una volta al suo interno, di replicarsi per generare molte copie di se stessa. Queste caratteristiche sono soddisfatte da due tipi di molecole di DNA presenti in natura:

- i **plasmidi**, piccoli DNA circolari che si trovano nei batteri e in alcuni altri organismi. I plasmidi sono in grado di replicarsi indipendentemente dal cromosoma della cellula ospite;
- i **cromosomi virali**, e in particolare quelli dei **batteriofagi**, cioè i virus che infettano specificamente i batteri. Durante l'infezione, il DNA del batteriofago viene iniettato all'interno della cellula ospite, dove si replica.

Il Capitolo 3 descrive come si purifica il DNA dalle cellule, sia il DNA da clonare sia quello del vettore, mentre il Capitolo 4 illustra le varie tecniche di manipolazione del DNA purificato in laboratorio; ne esistono molte, ma due sono particolarmente importanti per il clonaggio: la capacità di tagliare il vettore in un sito specifico e poi di riparare tale rottura, in modo da inserire il gene di interesse (► Figura 1.1). Lo sviluppo di queste e altre tecniche di manipolazione del DNA è avvenuto collateralmente alla ricerca di base sui meccanismi di sintesi e modificazione del DNA nelle cellule viventi. Nella maggior parte dei casi, per queste manipolazioni vengono utilizzati enzimi purificati. Nel Capitolo 4 illustreremo le proprietà di questi enzimi e come vengono usati negli studi sul DNA.

Una volta ottenuta la molecola di DNA ricombinante, questa deve essere introdotta nella cellula ospite affinché si replichi. Il trasporto all'interno della cellula sfrutta i processi naturali di trasferimento dei plasmidi e del DNA virale. Questi processi e il loro utilizzo nel clonaggio dei geni saranno argomento del Capitolo 5, mentre nei Capitoli 6 e 7 illustreremo i principali tipi di vettori di clonaggio e il loro utilizzo. Per concludere l'illustrazione dei vari aspetti legati alle tecniche di clonaggio, nel Capitolo 8 ci occuperemo del problema della selezione (► Figura 1.4), per poi tornare, nel Capitolo 9, a descrivere in maniera più dettagliata la PCR e le tecniche a essa correlate.

Bibliografia

Blackman, K. (2001). The advent of genetic engineering. *Trends in Biochemical Science*, 26: 268-270. [Un resoconto degli esordi del clonaggio genico.]

Brock, T. D. (1990). *The Emergence of Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. [Un resoconto della scoperta di plasmidi e batteriofagi.]

Brown, T. A. (2006). *Genomes*, 3^a ed. Garland Science, Oxford. [Un'introduzione alla genetica e alla biologia molecolare moderne.]

Cherfas, J. (1982). *Man Made Life*. Blackwell, Oxford. [La storia degli esordi dell'ingegneria genetica.]

Cohen, S. N. (2013) DNA cloning: a personal view after 40 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 110: 15521-15529. [L'autore è una tra le prime persone che effettuarono gli esperimenti di clonaggio all'inizio degli anni '70.]

Judson, H. F. (1979). *The Eighth Day of Creation*. Penguin Science, London. [Un resoconto molto accessibile dello sviluppo della biologia molecolare prima della rivoluzione del clonaggio genico.]

Mullis, K. B. (1990). The unusual origins of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4): 56-65. [Un racconto divertente sull'invenzione della PCR.]

Terry A. Brown

Biotecnologie molecolari

Principi e tecniche

Terza edizione italiana condotta sull'ottava edizione inglese

A cura di Giovanni Maga

Lavorare con il DNA significa stare al passo con lo straordinario progresso che negli ultimi anni sta investendo le tecnologie di sequenziamento e di modifica del DNA.

La terza edizione italiana di *Biotecnologie molecolari* registra gli indispensabili aggiornamenti in quest'ambito e ne rende facilmente comprensibili i principi generali e le applicazioni. Il testo, infatti, si distingue per la semplicità con cui sono spiegate le tecniche biomolecolari, grazie anche alla presenza di oltre 250 illustrazioni, e per come ne descrive le ricadute sulla biologia moderna e sui settori medico, agricolo, forense e archeologico.

Tra gli aggiornamenti più importanti, l'editing genomico (tecnologie CRISPR) è stato rivisto e approfondito, illustrandone gli aspetti tecnici e pratici, compresi quelli in ambito agrario. Anche i capi-

toli dedicati all'analisi del DNA sono stati ampliati e ora includono le tecniche di PCR più innovative e le forme di sequenziamento di nuova generazione, fronti in continuo spostamento.

Largo spazio è dedicato alla trascrittomica e alla proteomica, con le loro ricadute pratiche nella ricerca e nella medicina, e sono inoltre trattati per la prima volta argomenti come l'analisi delle curve di fusione dei prodotti della real time PCR, l'identificazione genetica delle mutazioni coinvolte nelle malattie umane e gli studi sugli incroci tra *Homo neanderthalensis* e *Homo sapiens*.

Anche gli ultimi quattro capitoli, che si occupano di applicazioni biotecnologiche del clonaggio e dell'analisi del DNA, sono stati aggiornati.

Con l'app **Guarda!** si possono visualizzare i video e attivare i quiz interattivi anche sullo smartphone.

Terry A. Brown è professore emerito di Archeologia biomolecolare presso la School of Earth and Environmental Sciences della University of Manchester. È autore di importanti libri di genetica, genomica e biochimica e ha pubblicato oltre 150 articoli scientifici.

Le risorse multimediali



online.universita.zanichelli.it/brown3e

A questo indirizzo sono disponibili le risorse multimediali di complemento al libro. Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su **my.zanichelli.it** inserendo il codice di attivazione personale contenuto nel libro.

Libro con ebook



Chi acquista il libro nuovo può accedere gratuitamente all'**ebook**, seguendo le istruzioni presenti nel sito. L'ebook si legge con l'applicazione *Booktab*, che si scarica gratis da App Store (sistemi operativi Apple) o da Google Play (sistemi operativi Android).

L'accesso all'ebook e alle risorse digitali protette è personale, non condivisibile e non cedibile, né automaticamente né con la cessione del libro cartaceo.

BROWN*BIOTECNOL MOLECOLARI 3ED LUMK

ISBN 978-88-08-49991-2



9 788808 499912

4 5678901 (60H)