

# CORSO GIORNO 3

## L'analisi del DNA

### 1. La differenza genetica

L'argomento di oggi è l'analisi del DNA, cioè quella procedura che ci consente di individuare le caratteristiche uniche di una specie o di un individuo che sono codificate nel suo DNA. Premetto che non c'è tempo di illustrare la fondamentale procedura di **sequenziamento**, cioè il metodo utilizzato per arrivare a conoscere l'esatta sequenza nucleotidica dei singoli

geni di una specie. Oggi questa procedura è automatizzata e molto veloce, per cui i genetisti conoscono ormai la sequenza completa del DNA di moltissime specie, uomo compreso. Il progetto genoma si è concluso nel 2004, in anticipo rispetto a quanto previsto grazie alla collaborazione di molti laboratori di biologia molecolare in tutto il mondo.

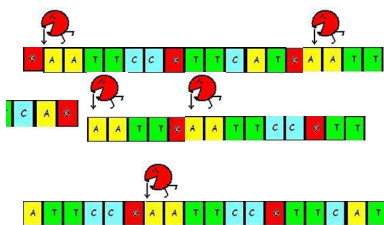
Qualunque analisi non può prescindere dalla conoscenza della sequenza nucleotidica dei geni da esaminare, cosa che dunque non è l'oggetto dei test sul DNA; l'obiettivo di tali analisi è diverso, cioè **riconoscere le piccole differenze** individuali o di specie nella sequenza nucleotidica di base di un determinato gene.

### Geni a confronto: cyt B di pollo e di mucca (primi 250 nucleotidi)

```

gi15834843_14893-16035      ATGGCACCCAACATTGGAAAATCCACCCCTACTAAAAATAATTAACAA 50
gi160101824_14514-15653    ---ATGACTAACATTGGAAAATCCACCCCTACTAAAAATAATTAACAA 47
                               * * * * *
gi15834843_14893-16035      CTCCTAATCGACCTCCAGCCCATCCAAACATCTCTGCTTGATGAAATT 100
gi160101824_14514-15653    TGCATTCATCGACCTTCAGCCCATCAACATTCATCATGATGAAATT 97
                               * * * * *
gi15834843_14893-16035      TGGCTCCCTATTAGCACTGCTGCCTCATGACCCAAATCCCTACCGGCTA 150
gi160101824_14514-15653    TCGGTCCCTCTGGGAATCTGCCTAATCCTACAAATCCCTACAGGCTA 147
                               * * * * *
gi15834843_14893-16035      CTACTAGCCATGCACTACAGCAGACACATCCCTAGCCTTCTCTCCGT 200
gi160101824_14514-15653    TTCCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACAACAGCATTCTCTCTGT 197
                               * * * * *
gi15834843_14893-16035      AGCCACACTTCCGGAACTGACAAATAGGGCTGACTCATCCGGAAATCC 250
gi160101824_14514-15653    TACCCATATCTCCGAGAGCTGAACTAGGGCTGAAATCATCCGATACATC 247
                               * * * * *
    
```

asterischi mettono in evidenza le parti comuni ad entrambi i geni. Cosa accade se sequenze simili ma non identiche vengono sottoposte a taglio con enzimi di restrizione?



posizioni sulle due catene.

Si troveranno sul gene le cosiddette **RFLP**, cioè dei polimorfismi nella lunghezza dei frammenti di restrizione. Infatti lo stesso sito di restrizione sarà presente in entrambi i geni ma messo in punti diversi.

Se sottoponiamo due DNA diversi al taglio con lo stesso enzima di restrizione, esso produrrà frammenti di lunghezza diversa in quanto i siti di restrizione si trovano in differenti

Ora bisogna separare e mettere in evidenza questi frammenti, attraverso una procedura detta **ELETTROFORESI**. Un supporto di gel-agarosio contiene dei pozzetti nei quali viene inserito il DNA frammentato; il gel viene appoggiato in un bagno di soluzione elettrolitica tampone a cui viene applicata una diff. di potenziale; poiché il DNA in soluzione presenta

cariche negative dovute ai gruppi fosfato, i frammenti vengono attratti **verso il polo positivo** della camera elettroforetica. Si assiste dunque ad una migrazione dei frammenti lungo il gel che chiamiamo corsa elettroforetica. I frammenti più lunghi e pesanti si muovono più lentamente di quelli corti e leggeri, quindi si avrà, a fine corsa, una separazione dei frammenti **in base alla lunghezza** e quindi al peso. I più leggeri sono quelli in basso, verso il polo +

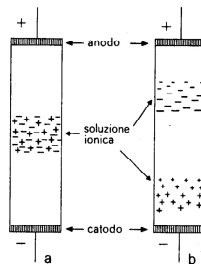


Fig. 4-100 - Migrazione elettroforetica.

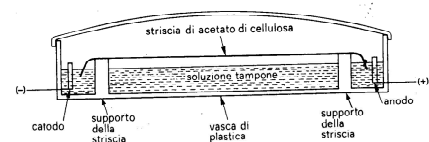
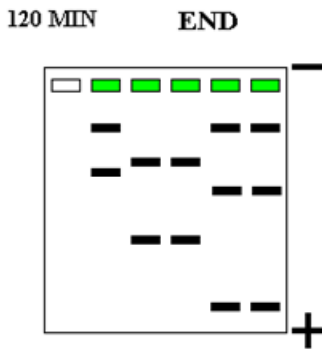


Fig. 4-101 - Vasca per elettroforesi.



Terminata la corsa i frammenti risulteranno ancora invisibili a occhio nudo. Per evidenziarne la posizione sul gel vanno trattati con **etidio bromuro**, una sostanza che si insinua nella doppia elica e che reagisce agli UV rimandando una luminescenza arancione. Tenendo il gel a bagno in bromuro di etidio e poi illuminandolo con luce UV si vedranno le bande arancioni corrispondenti ai frammenti di DNA. Se si analizzano più campioni di DNA da specie diverse, ciascuno in un pozzetto, potremo apprezzare le differenze di specie osservando la **diversa disposizione delle bande** sul gel.

Vediamo qualche applicazione del **DNA fingerprinting** tra quelle più note:

**IDENTIFICAZIONE DI SPECIE** ( per frodi alimentari oppure in diagnostica fitopatologica)

**PROCEDURE FORENSI** ( accertamento di paternità o parentela, identificazione di una vittima o di un colpevole...)

**DIAGNOSI DI PREDISPOSIZIONE A MALATTIE**

| BANDE PRODOTTE DALL'ENZIMA DI RESTRIZIONE Hae III |        |        |          |
|---|--------|--------|----------|
| SUINO   | BOVINO | POLLO  | TACCHINO |
|   | 285 bp |        |          |
| 153 bp  |        | 159 bp |          |
| 132 bp  |        |        |          |
|   |        | 126 bp | 126 bp   |
|   |        |        | 103 bp   |
| 74 b  | 74 bp  | 74 bp  | 74 bp    |
|   |        |        | 56 bp    |
| BANDE PRODOTTE DALL'ENZIMA DI RESTRIZIONE Alu I   |        |        |          |
| SUINO   | BOVINO | POLLO  | TACCHINO |
|   |        | 359 bp | 359 bp   |
| 244 bp  |        |        |          |
|   | 190 bp |        |          |
|   | 169 bp |        |          |
| 115 bp  |        |        |          |

Un esempio pratico è l'accertamento della provenienza di una carne per prevenire o accertare eventuali frodi alimentari. Qui vediamo come si presentano le bande del cit b di quattro animali diversi se trattato con due enzimi di restrizione. Spesso infatti un solo enzima non dà risultati: vedete come Alu non consente di differenziare pollo da tacchino; il trattamento con HaeIII è risolutivo.

Un ultimo esempio:

qui vediamo il DNA di due fratelli gemelli ( notate la coincidenza assoluta delle bande) confrontato con quello dei genitori: le bande dei figli coincidono o con quelle paterne o con quelle materne. Negli esseri umani ci sono molti geni e alcuni presentano maggiore variabilità di altri; in medicina forense bisogna effettuare il fingerprinting su 8 loci genici contemporaneamente per avere la certezza dell'identificazione. La probabilità di coincidenza contemporanea di tutti e 8 i loci è inferiore a 1/ 6 miliardi, quanti sono gli esseri umani stimati sulla Terra.....



**DIAPO 13** – riassumiamo allora i passaggi principali della procedura di analisi del DNA detta “fingerprinting”, cioè “impronta digitale”. Il primo passo lo abbiamo già compiuto; mentre vi parlo gli enzimi di restrizione stanno tagliando i campioni di DNA nei punti precisi noti come siti di restrizione ; si otterranno frammenti di doppia elica che saranno separati grazie all'elettroforesi. Una sostanza fluorescente capace di insinuarsi nella doppia elica ci permetterà di osservare la disposizione dei frammenti, le cosiddette “bande” e di confrontare così DNA di provenienza diversa.

## L'analisi del DNA

### 2. Isolamento e amplificazione

Cerchiamo ora di capire quale parte del DNA di un individuo è opportuno sottoporre ad analisi e come poter disporre di un quantitativo di campione sufficiente per effettuarla.

Ogni volta che desideriamo sottoporre ad analisi il DNA estratto da un vivente, noi abbiamo a disposizione **l'intero genoma** dell'individuo; se pensiamo che un essere umano condivide con uno scimpanzé il 99% dei geni, comprendiamo come sia importante non la porzione di DNA che abbiamo in comune, ma **quella piccola porzione che ci differenzia** come specie ( e, nell'ambito della nostra specie, quelle piccole porzioni che ci differenziano come individui). Dobbiamo perciò ricorrere ad un metodo che ci permetta di isolare ed analizzare solo qualche gene, tra i tanti presenti nel campione.



Condividiamo

il 99% dei

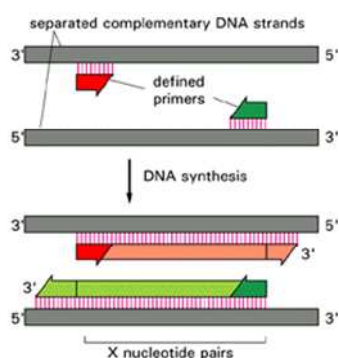
geni con gli

scimpanzé



Il metodo più efficace, preciso e veloce per selezionare ed amplificare un gene è la tecnica detta **PCR**, cioè reazione a catena della polimerasi, inventata nel 1989 da un allora giovane ricercatore americano, Kary Mullis, che letteralmente mise il turbo alla ricerca genetica e gli valse il Nobel.

### I primers



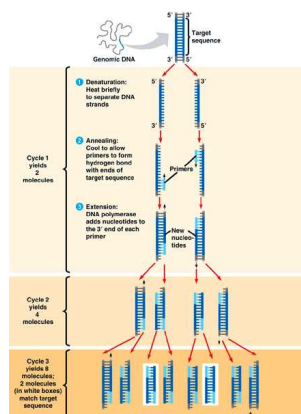
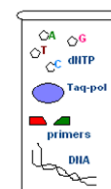
Si tratta di avviare artificialmente la duplicazione del DNA in un punto ben preciso del genoma, selezionato grazie ai cosiddetti **PRIMERS**, cioè brevi sequenze di ribonucleotidi, da 10 a 20, indispensabili normalmente a qualunque DNA-polimerasi per cominciare a copiare. Ce ne devono essere due per ogni segmento della doppia elica e vengono indicati con le sigle **FW** e **RW** cioè avanti e indietro. La loro **specificità** è molto alta, nel senso che ogni gene ha una sequenza iniziale di nucleotidi che è la stessa solo per i primi tre, poi cambia da gene a gene. Conoscendo i primi venti nucleotidi di ogni gene si possono sintetizzare in un laboratorio chimico i primers artificiali e si può utilizzarli per una duplicazione

artificiale.

Il DNA del campione, una volta estratto e purificato, viene miscelato con le molecole necessarie ad una normale duplicazione, cioè i deossiribonucleotidi, una speciale polimerasi estratta dal batterio **Thermophilus aquaticus** detta Taq-polimerasi capace di resistere ad alte temperature, i primers specifici per la sequenza da isolare e amplificare.

### La "mastermix"

- Deossiribonucleotidi
- Taq- polimerasi
- Primers
- DNA campione



La reazione a catena prevede una prima fase di apertura della doppia elica o **FASE di DENATURAZIONE** che si ottiene portando la miscela a 95°C. In seguito quando la temp. scende a 65°C si ha la **FASE di ANNEALING**, cioè appaiamento dei primers alle sequenze complementari che si trovano all'inizio del gene da amplificare.

La temp. viene di nuovo aumentata a 72°C, valore ottimale per la funzionalità della taq-pol la quale comincia a copiare; è la **FASE di ESTENSIONE**, che permette di raddoppiare le molecole del gene inizialmente presenti. Ogni ciclo di denaturazione+annealing+estensione viene ripetuto decine di volte da una apparecchiatura apposita detta termociclatore. Nel giro di 2 ore vengono prodotte oltre un milione di copie del gene selezionato dai primers, quantità sufficiente per effettuare le

successive analisi.