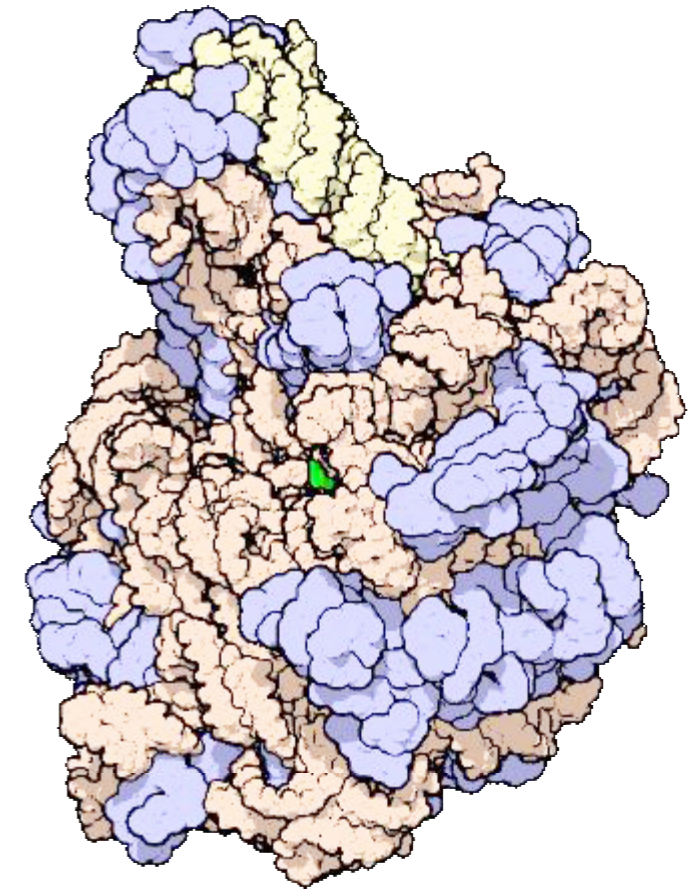
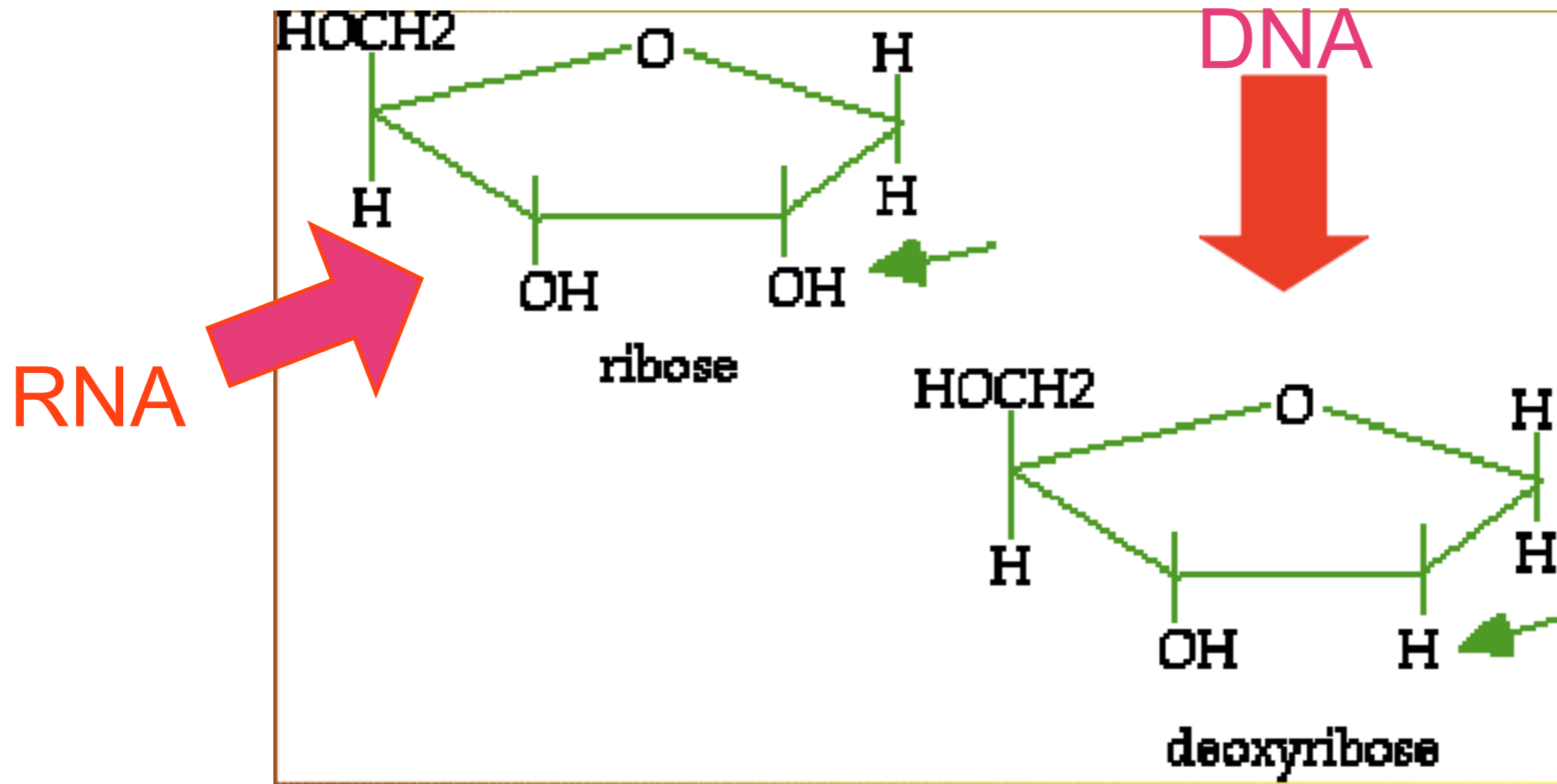


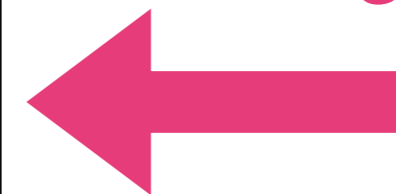
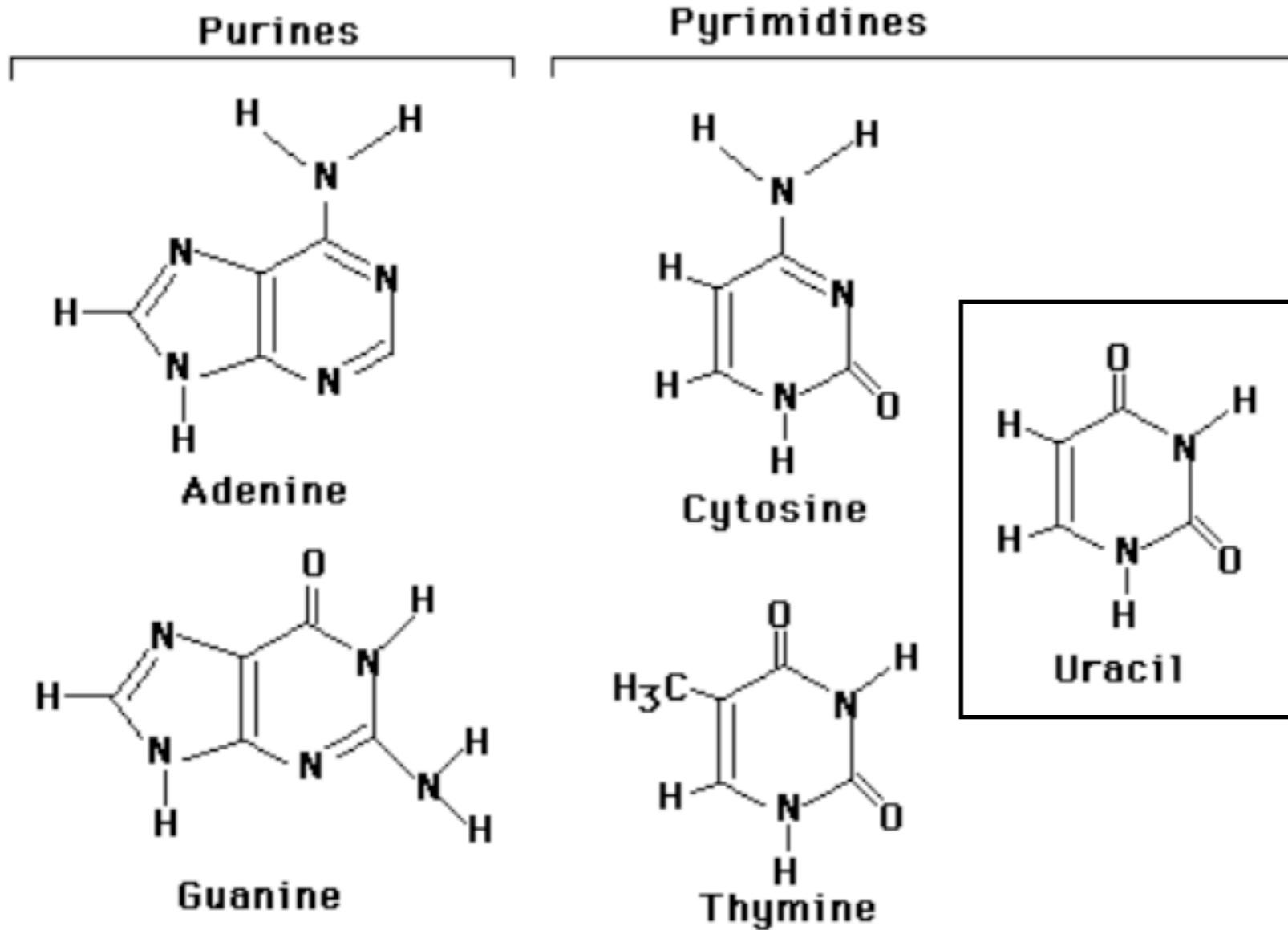
DNA RNA  
SINTESI PROTEICA  
GENETICA BATTERICA



# MONOSACCHARIDE



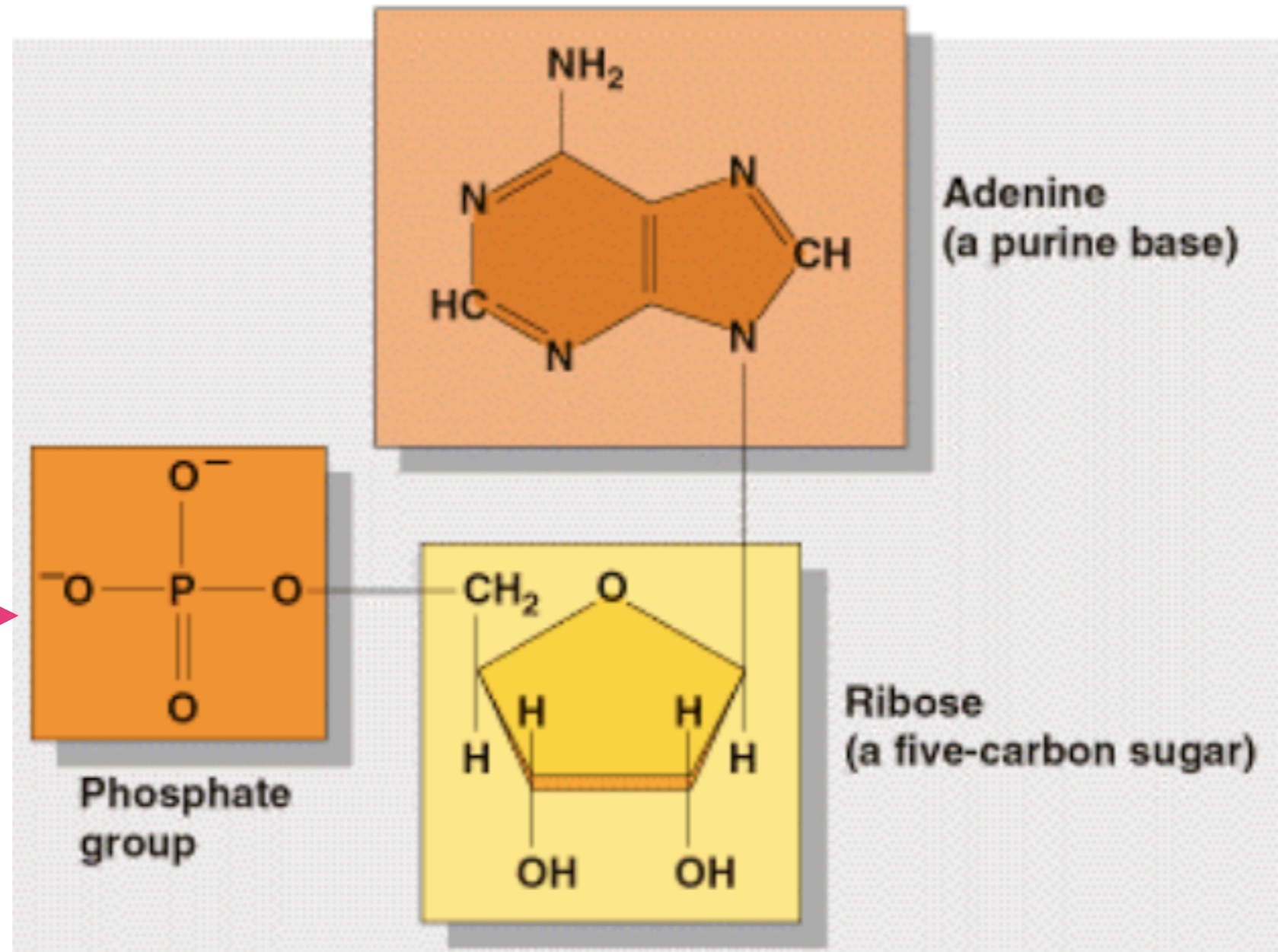
# BASI AZOTATE



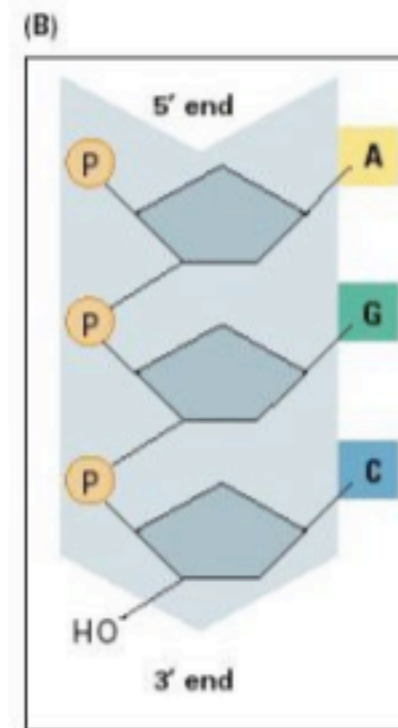
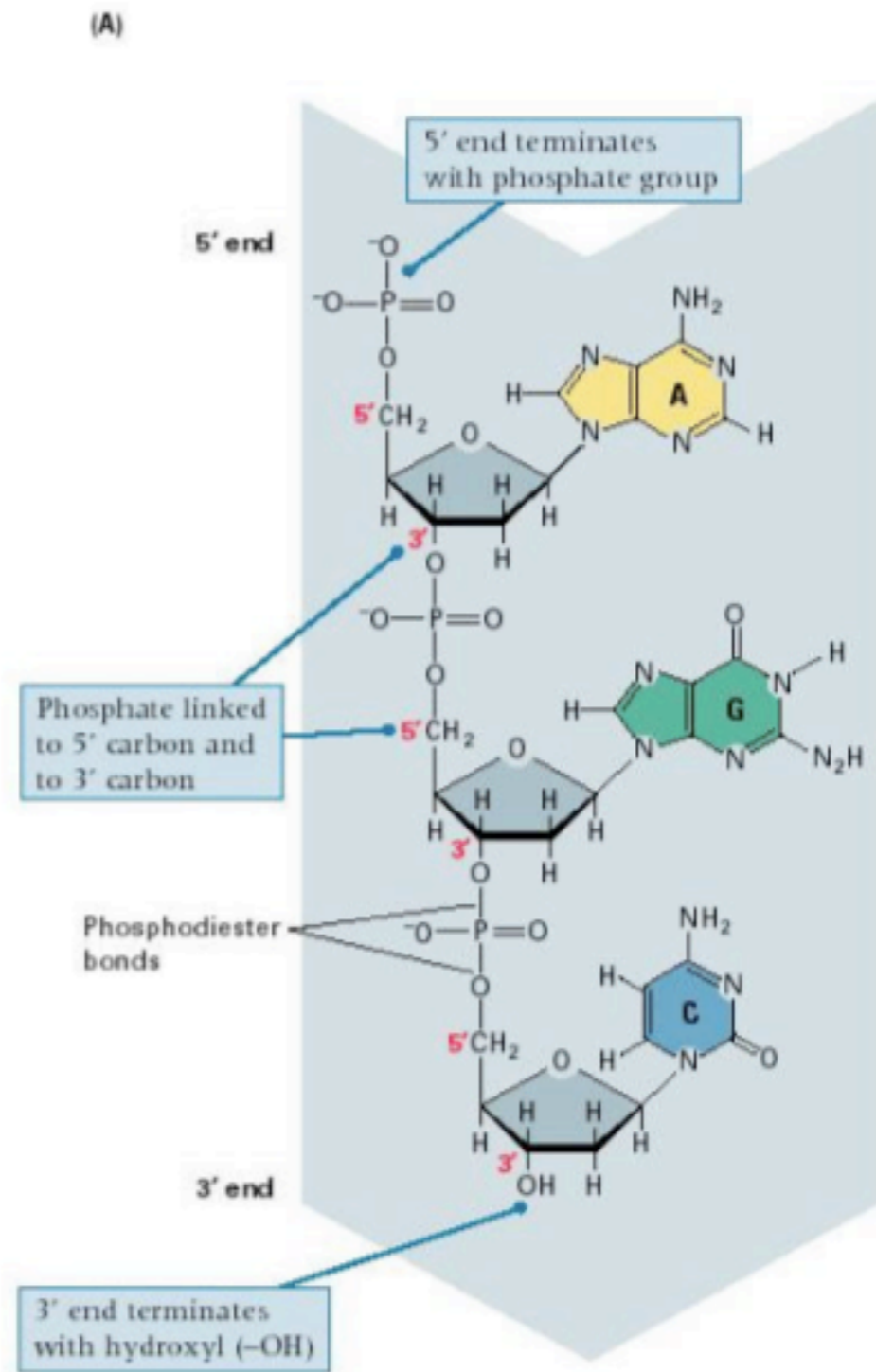
in RNA  
al posto  
di T

Fig. Structural formulas of the purines and pyrimidines.

# NUCLEOTIDE



Un gruppo fosfato  
legato al Carbonio  
in posizione 5'



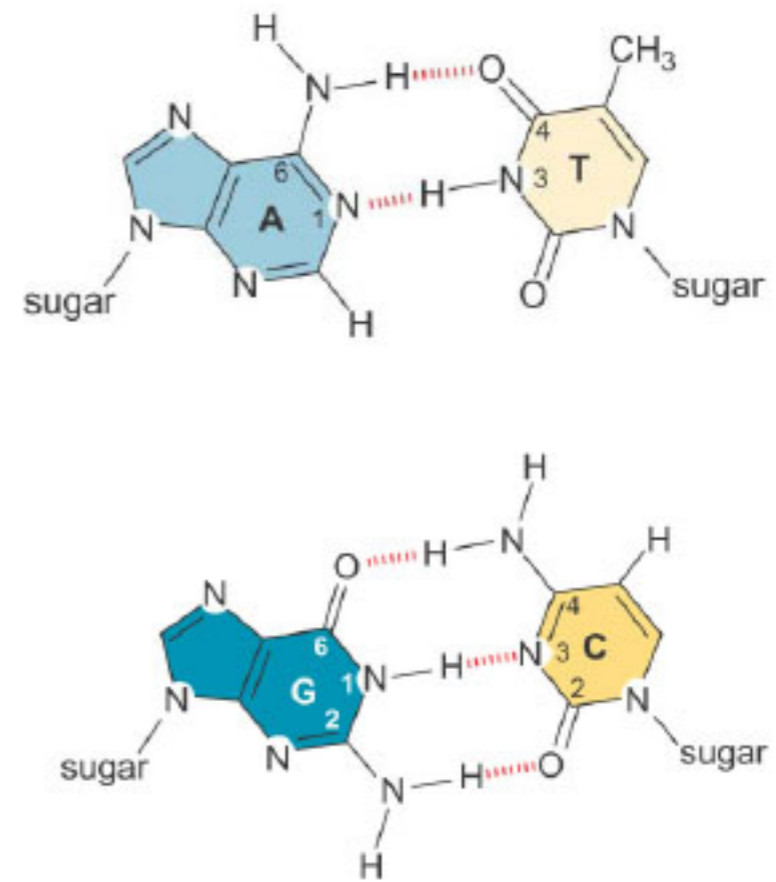
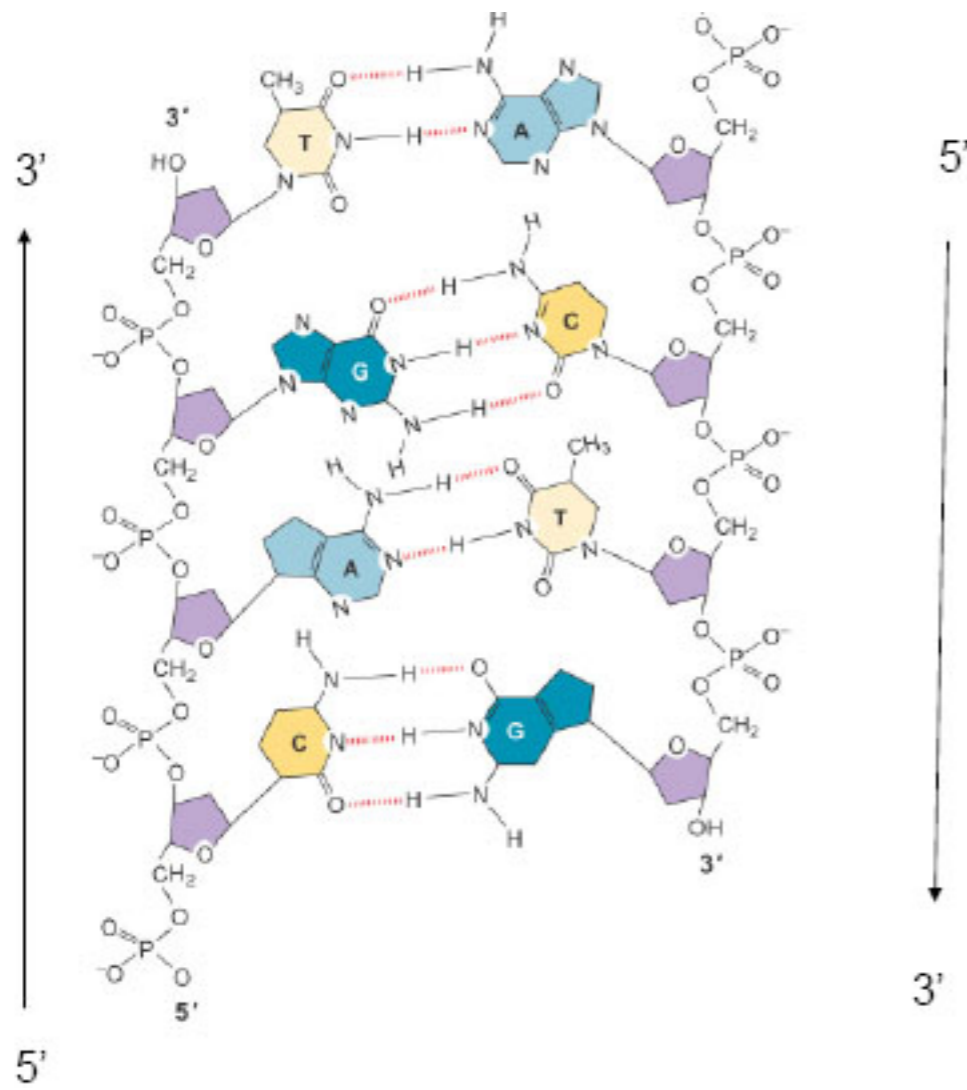
Link dei  
nucleotidi

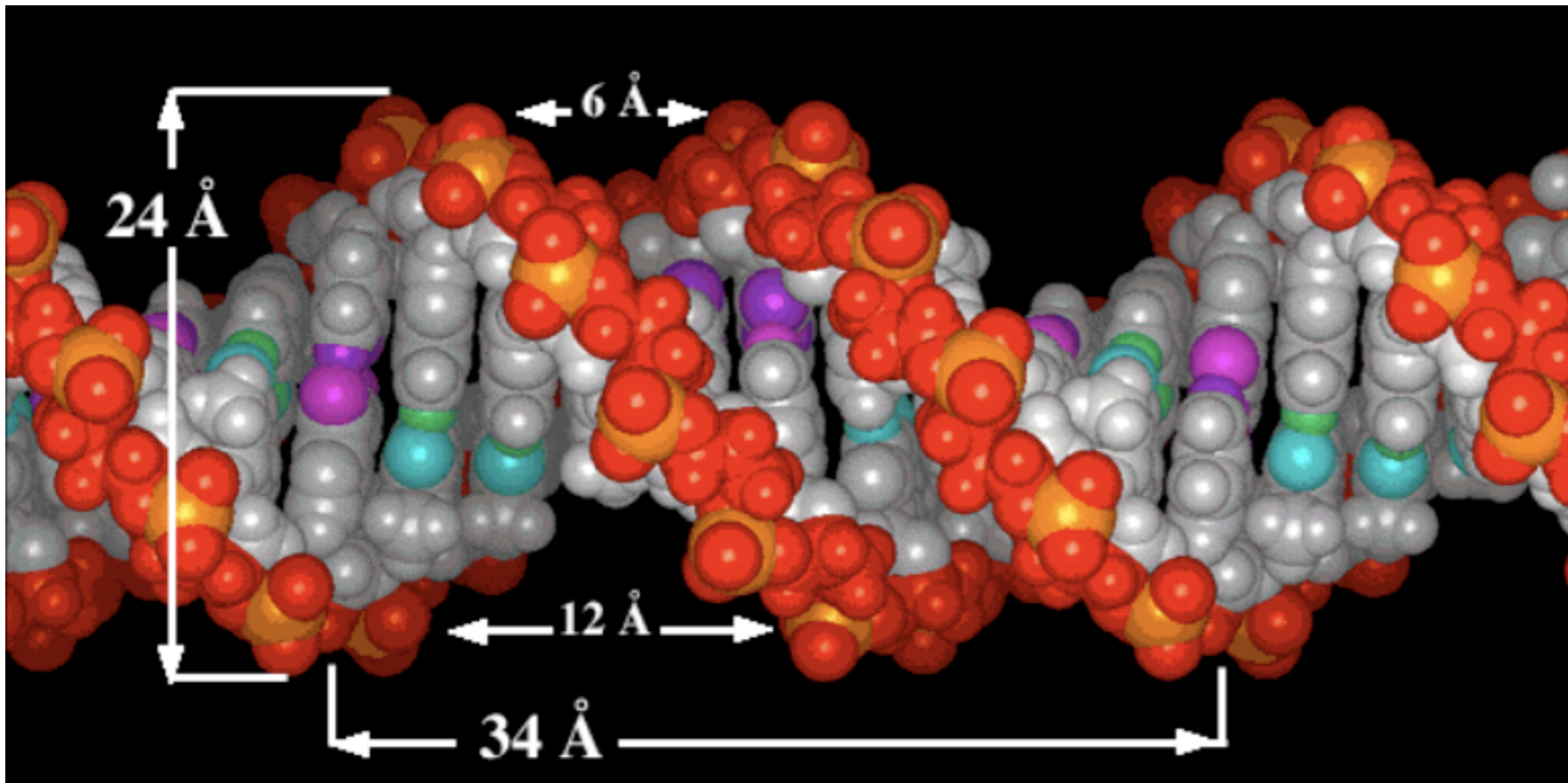
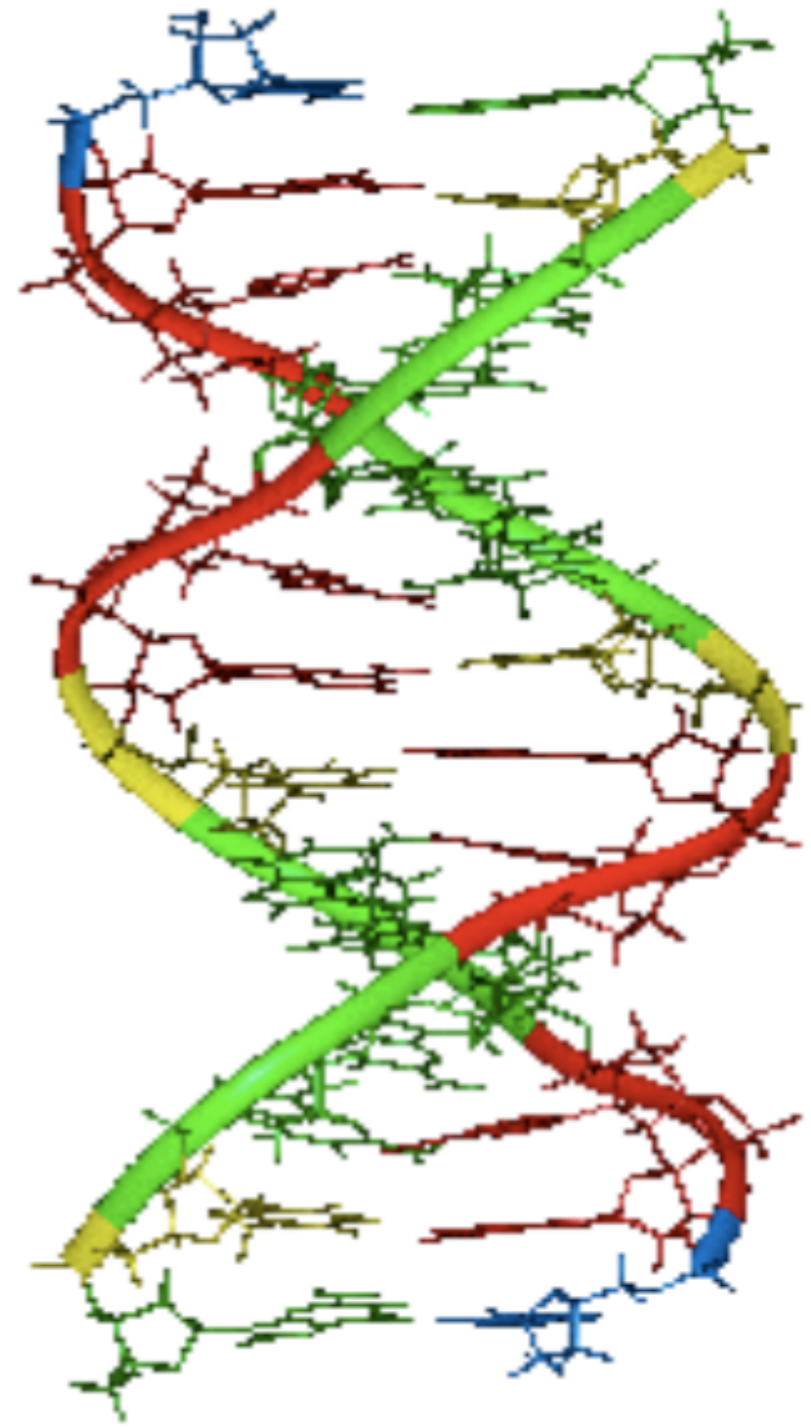
# ACCOPPIAMENTO DELLE BASI

A-T

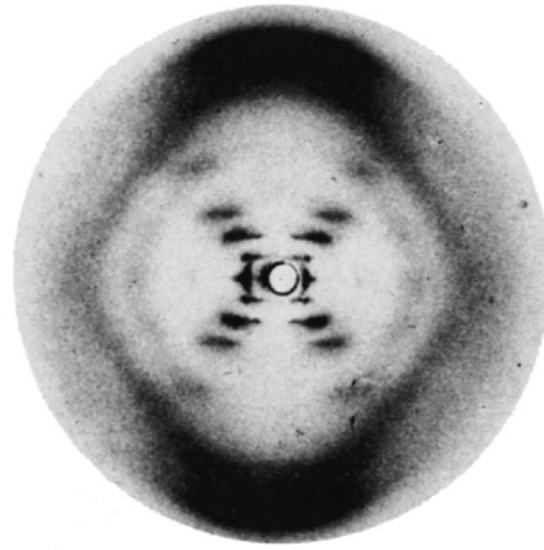
G-C

IN BASE AI LEGAMI A IDROGENO





## ULTERIORI STRUTTURE DEL DNA: FORMA B



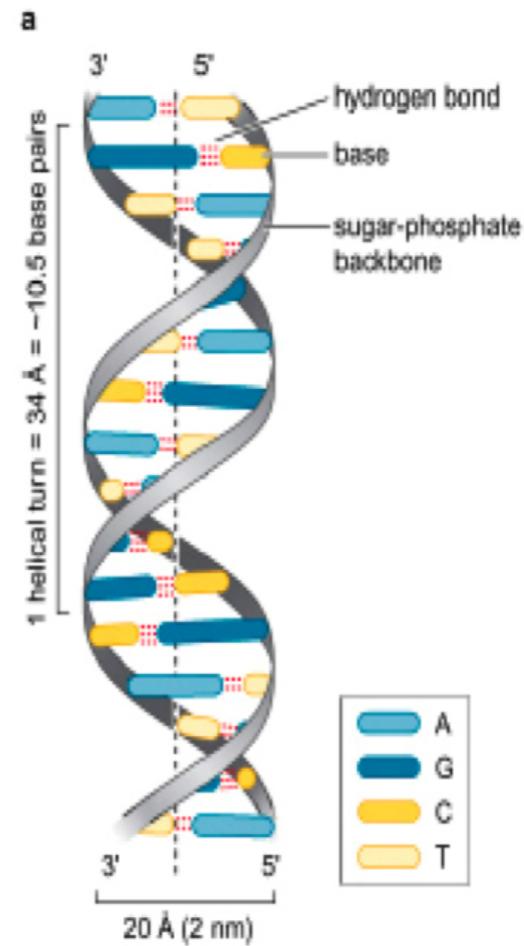
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Cristallografia e costruzione di modelli (Conferenza Cold Spring Harbor Laboratory 1953)

Forma B doppia elica  
destrorsa

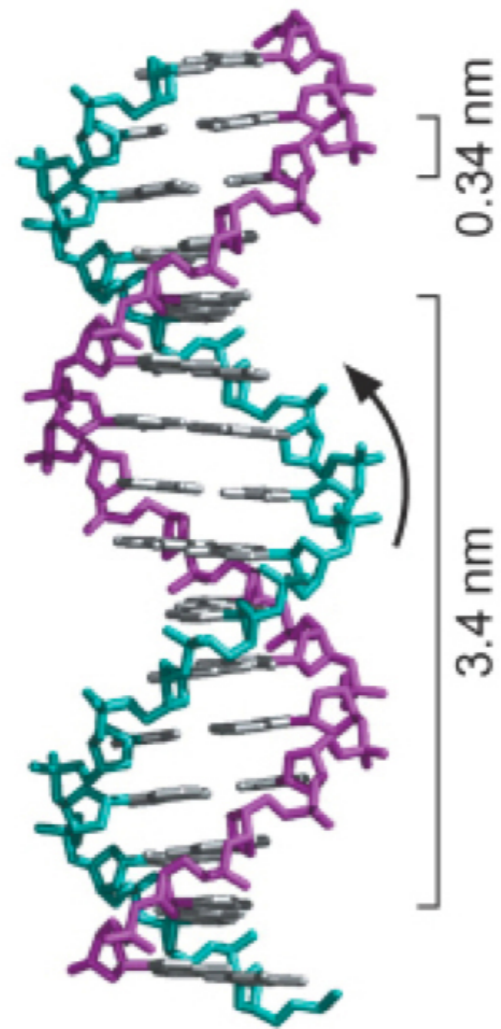
>92 % umidità

Na<sup>+</sup>

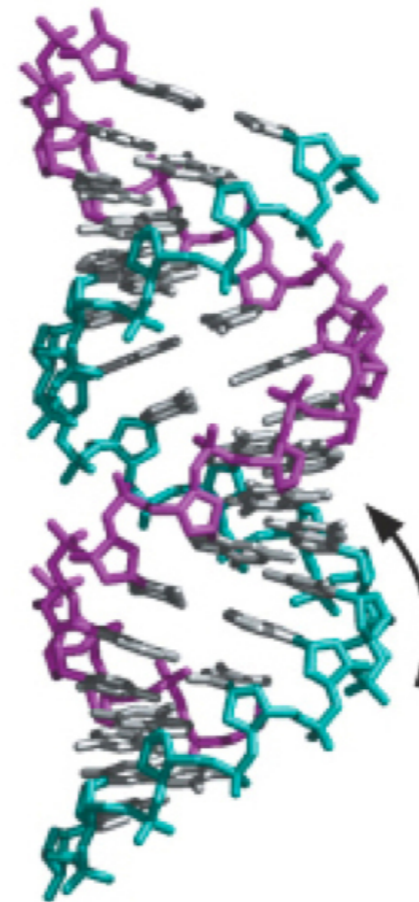




**DNA B**

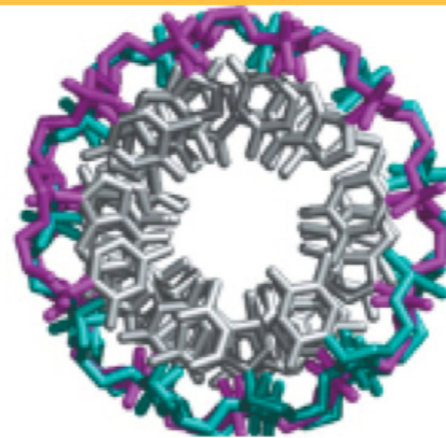
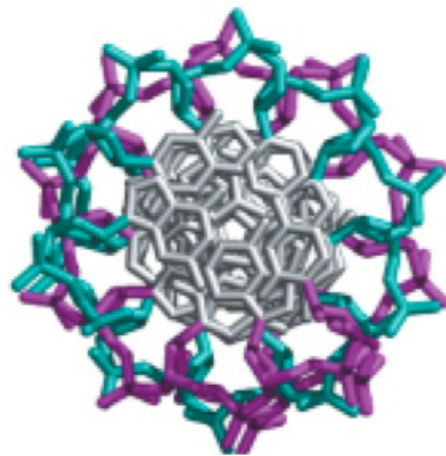


**DNA A**

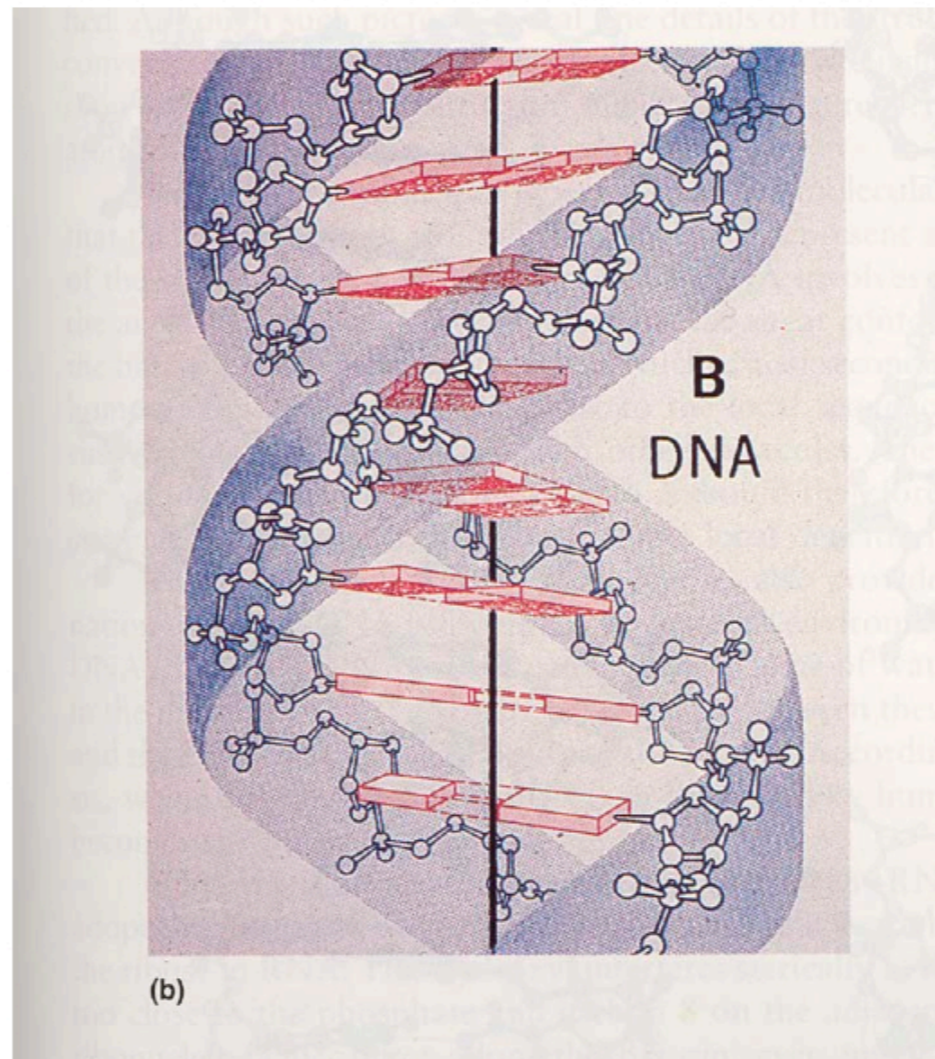


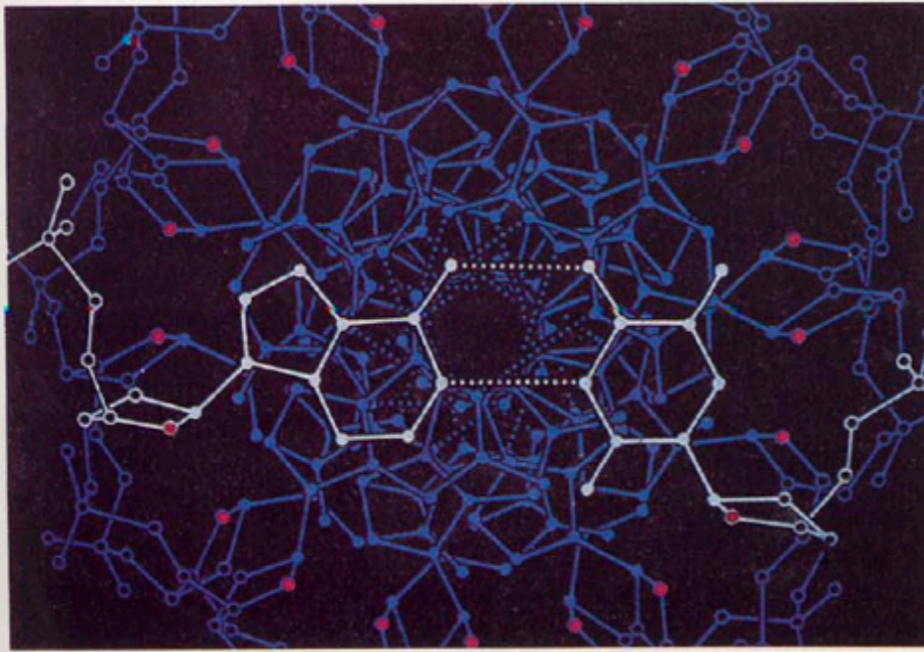
**Esempi di doppia elica di DNA A?**

**Negli ibridi DNA:RNA, nel ds RNA e in alcuni complessi DNA:proteine**

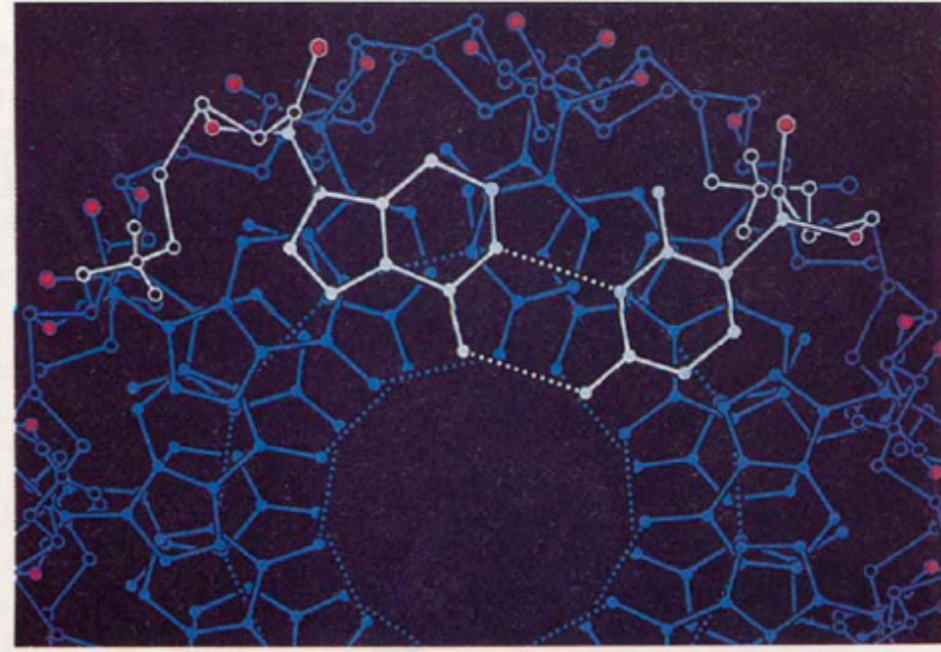


Inoltre le basi sono anche inclinate rispetto all'asse della doppia elica (angolo di **TILT**)

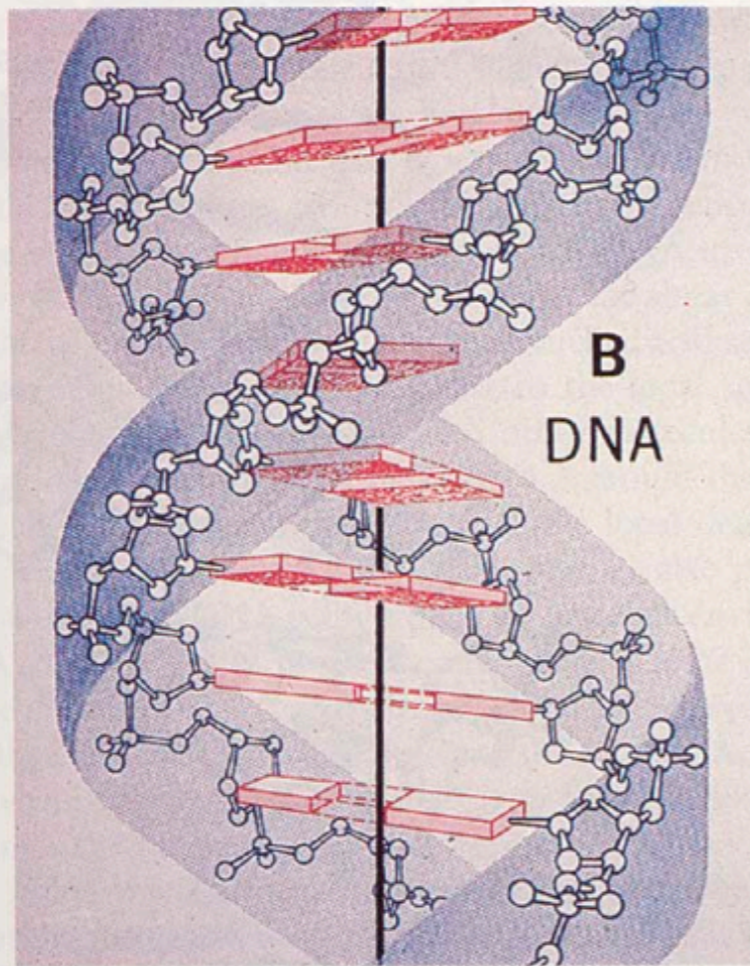




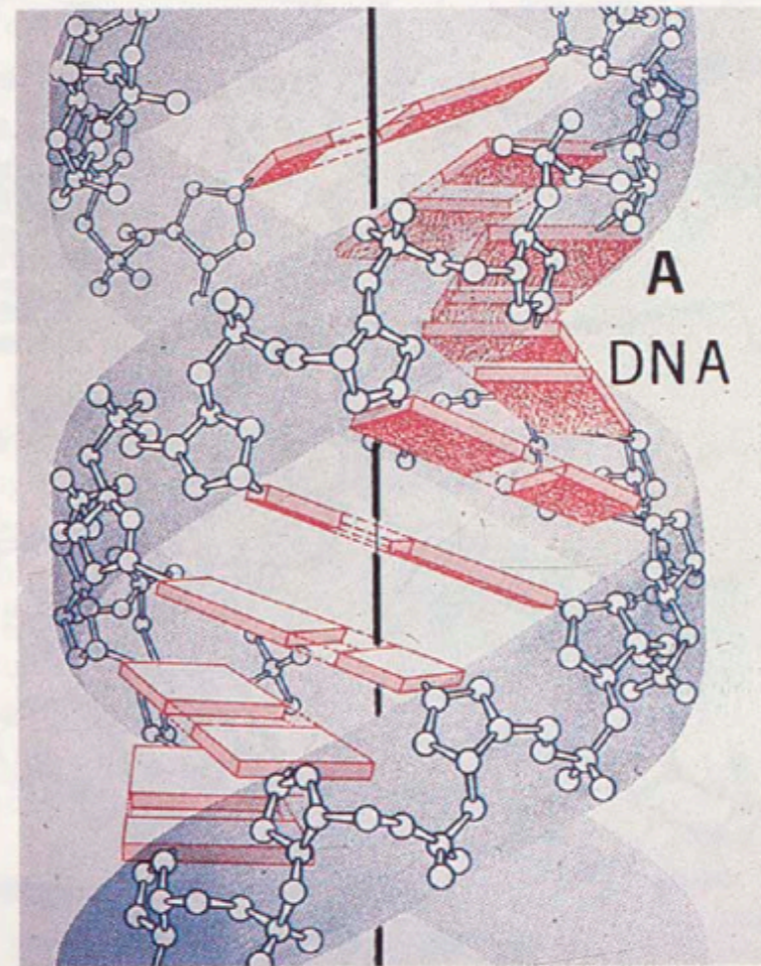
(a)



(c)



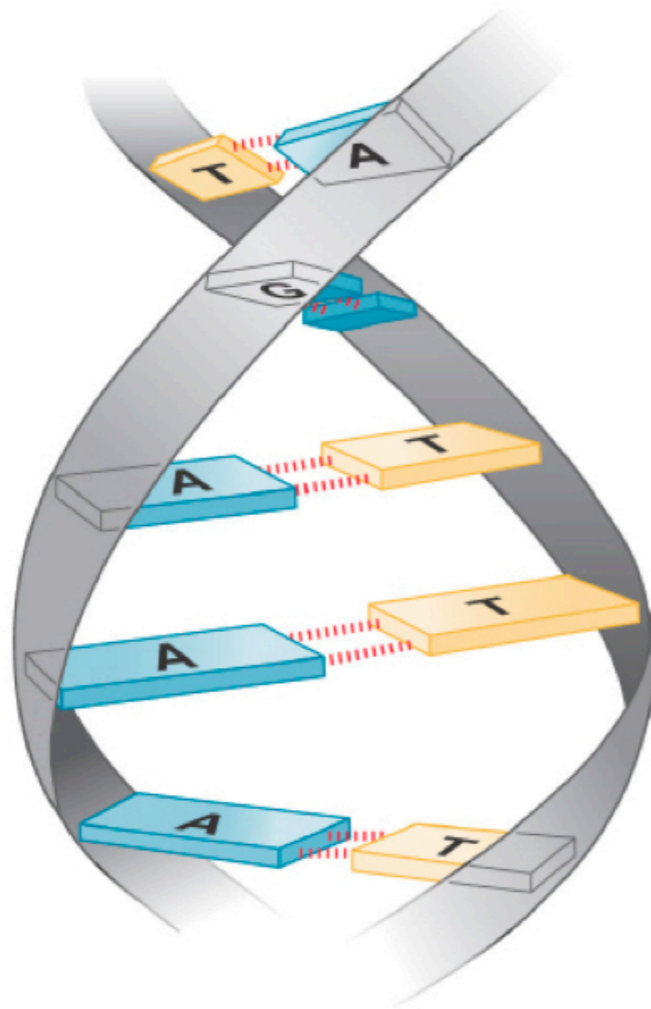
(b)



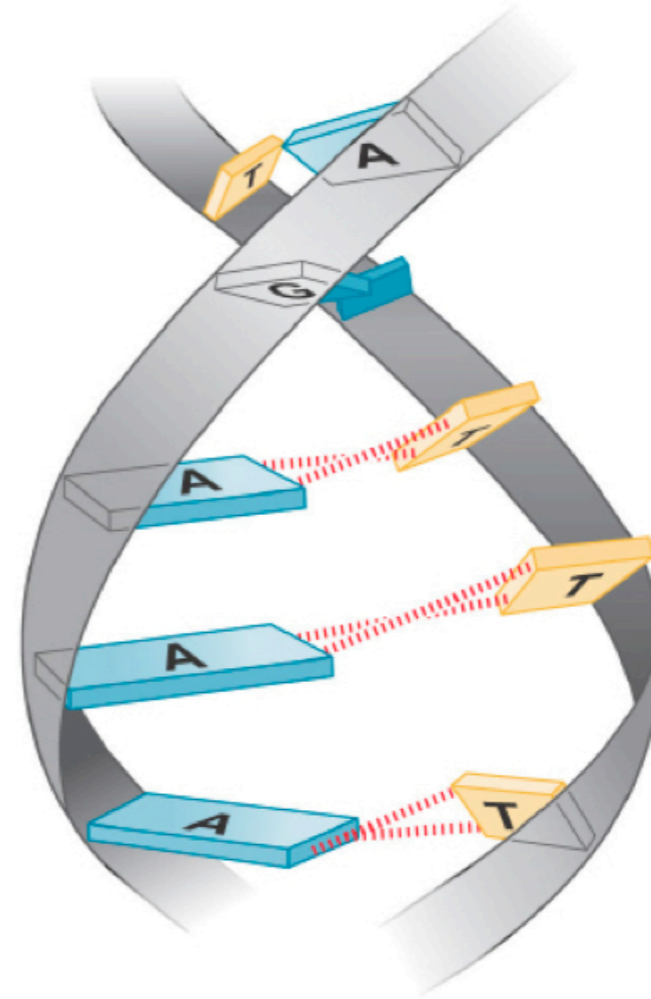
(d)

Nella doppia elica vi è un'inclinazione delle basi lungo l'asse maggiore del piano su cui giacciono (**propeller twist**)

a



b



# DNA Z

Scoperta del 1979.

Alexander Rich e colleghi (MIT)

Analisi di diffrazione ai raggi X di cristalli di un corto DNA ricco in CG in condizioni di alta salinità:

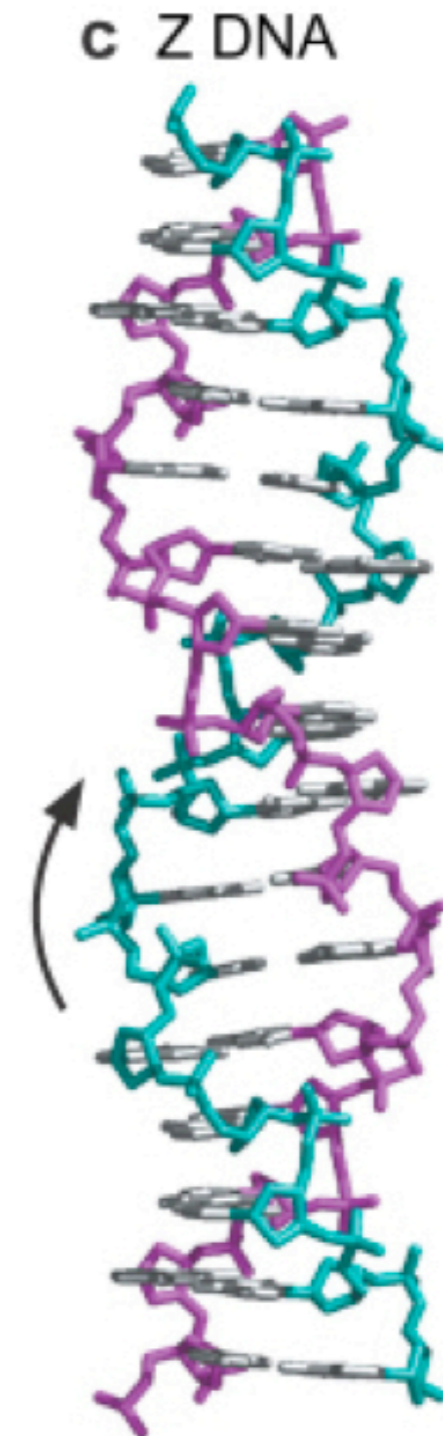
5'- CGCGCG – 3'

3'- GCGCGC – 5'

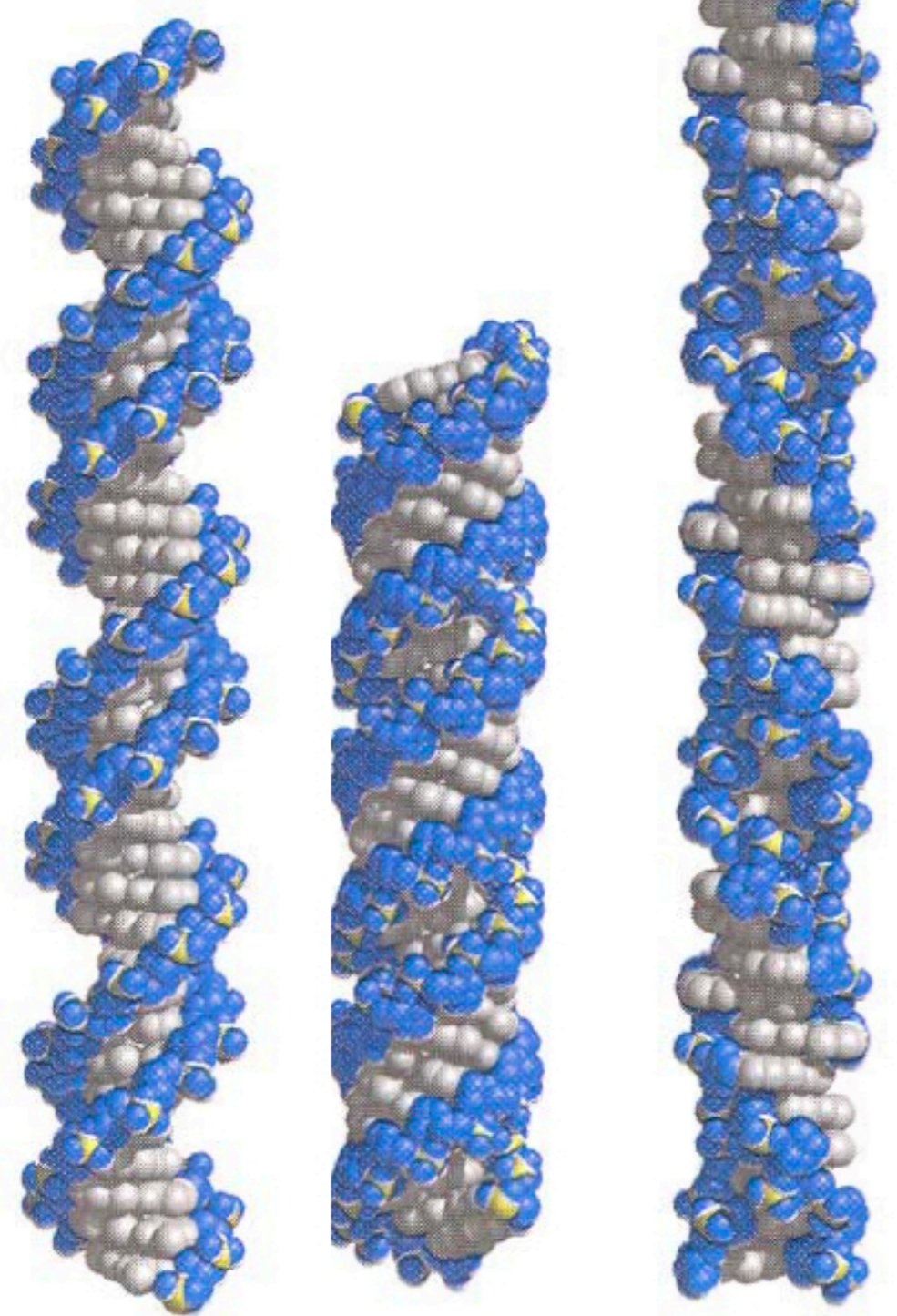
I dati erano compatibili con una struttura sinistrorsa detta **Z** a causa del pattern a zig-zag dei gruppi fosfato.

doppia elica sinistrorsa .

In bassi sali forma DNA B



# Confronto fra le forme di DNA A, B e Z



B form

A form

Z form

**Kinemage 1**

Ciascuna struttura rappresentata è formata da 36 coppie di basi.

# DUPLICAZIONE DEL DNA

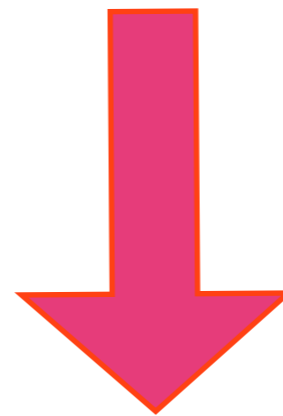
In più punti  
dell'elica



Legami H rotti da enzima  
ELICASI



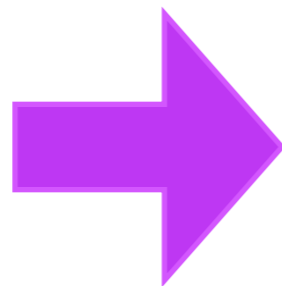
(Bolle di duplicazione)



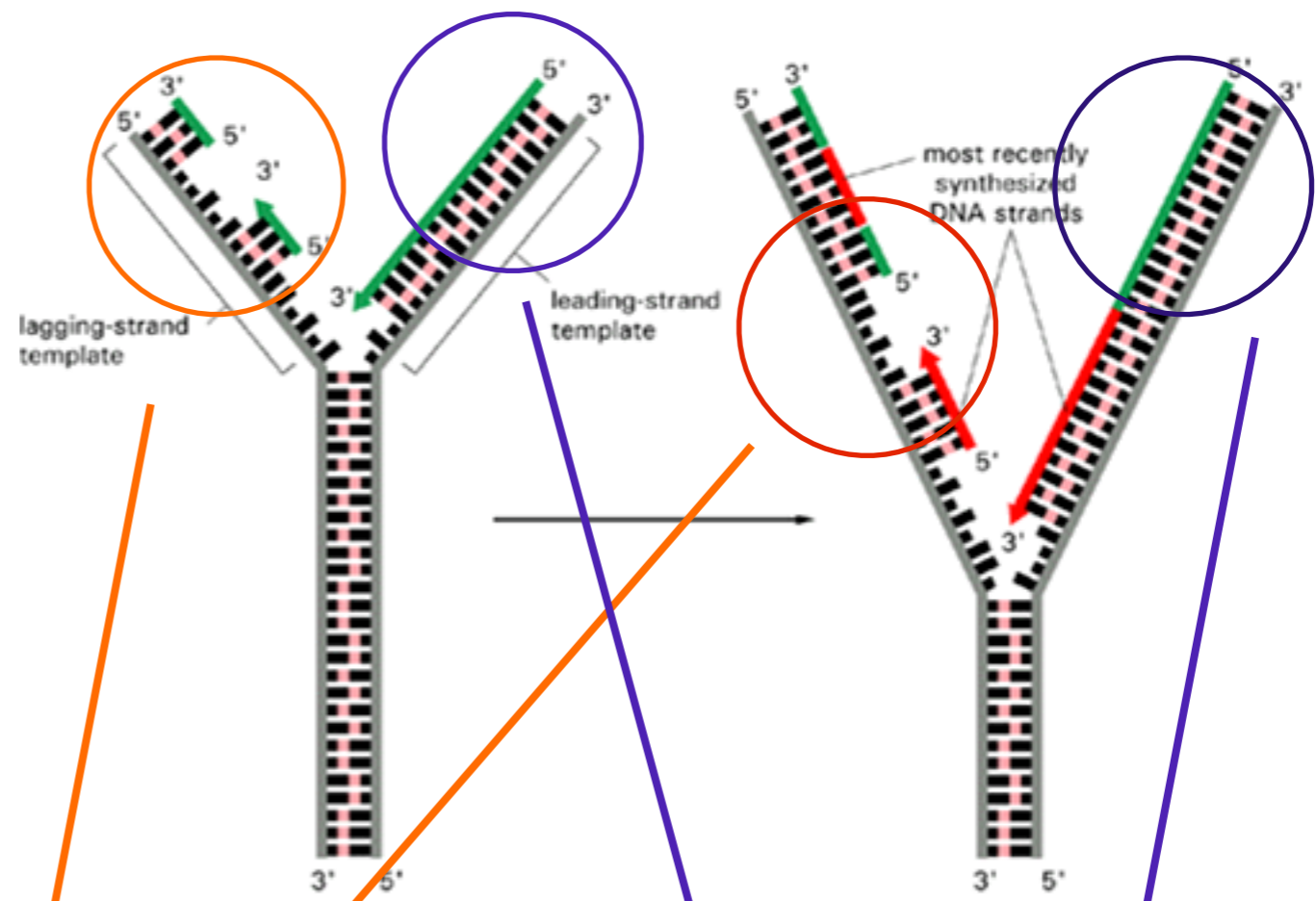
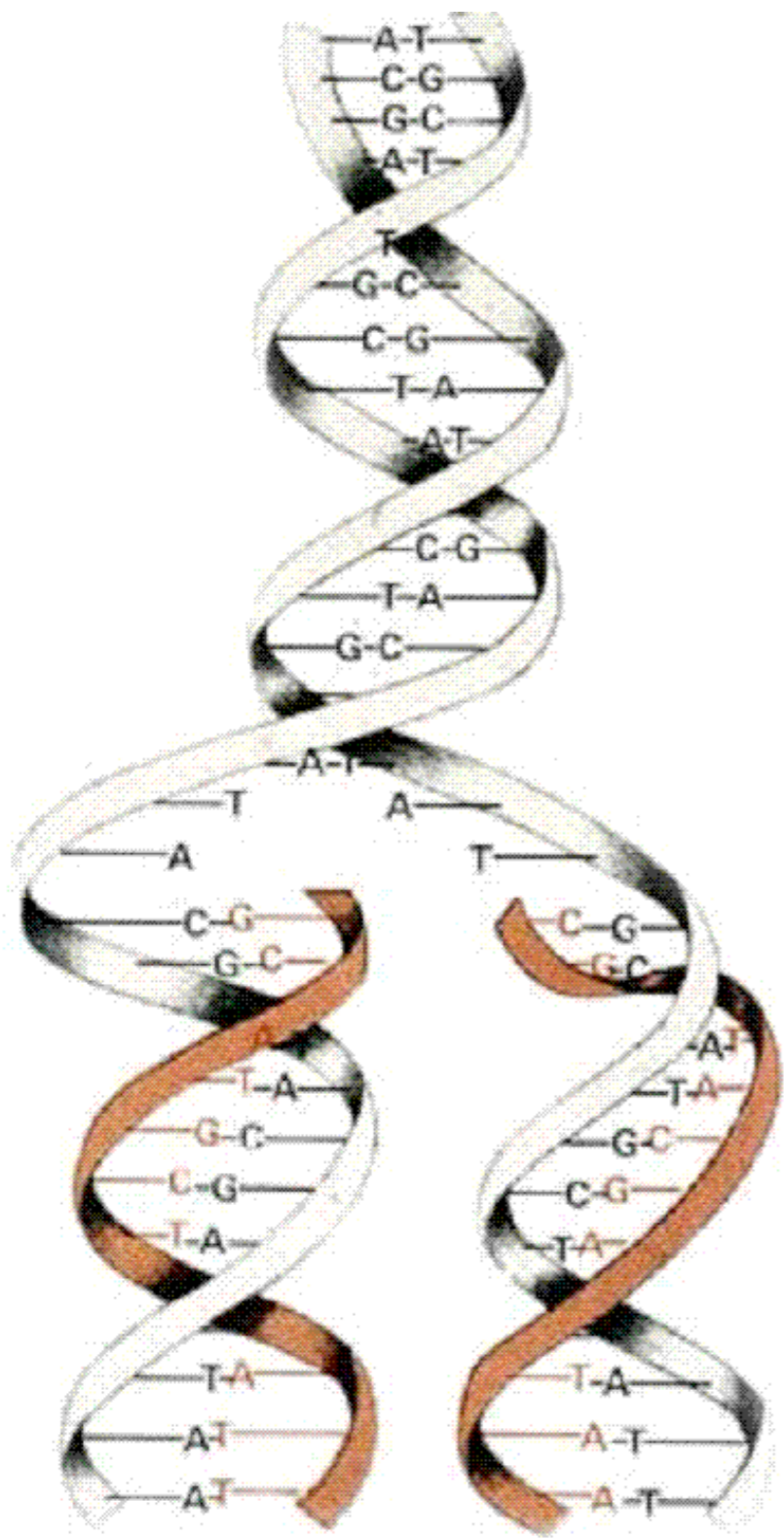
Forcella di duplicazione

Y

DNA  
POLIMERASI



Duplicazione elica con intervento di un Primer



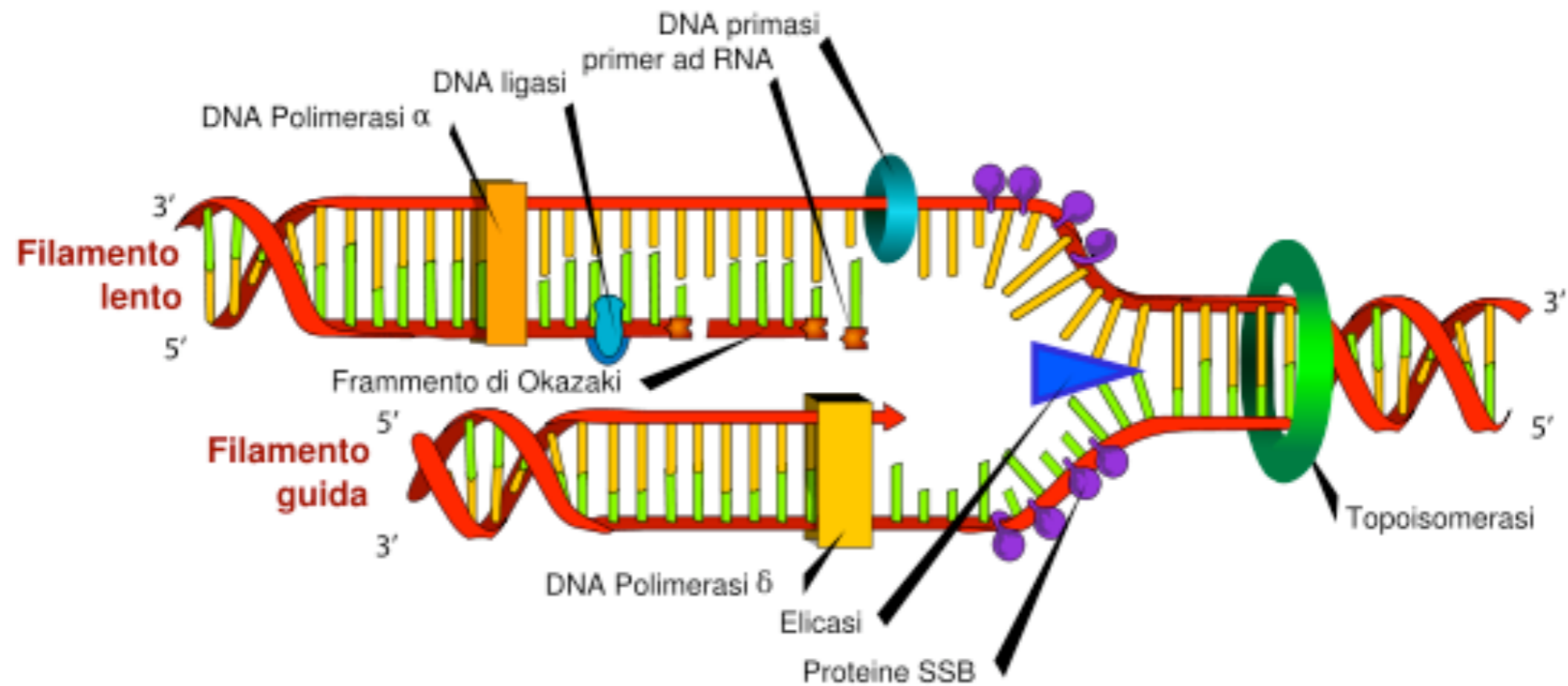
Elica copiata a pezzi

Elica copiata in continuo

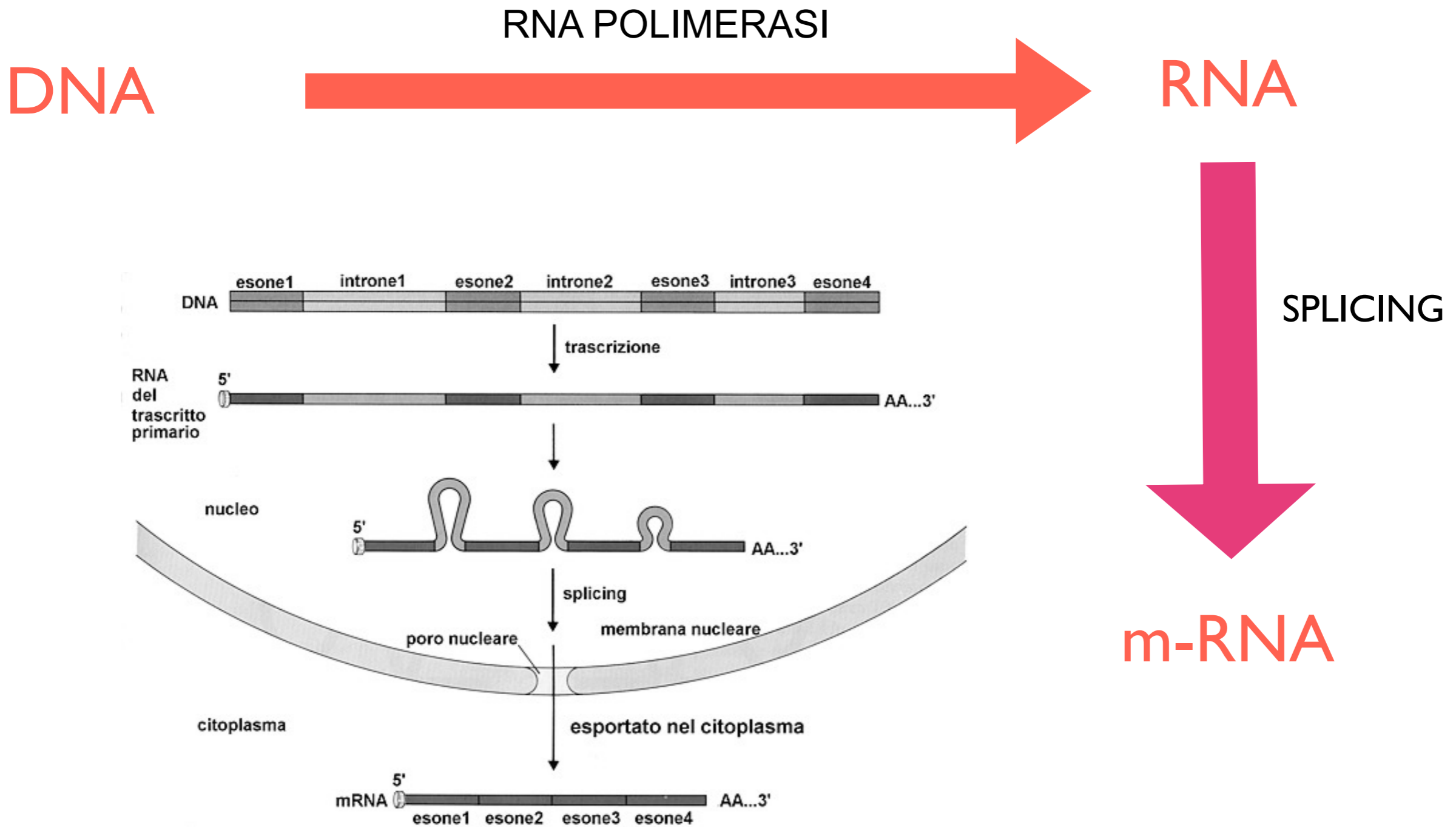
**FRAMMENTI  
DI OKAZAKI**



# DUPLICAZIONE DEL DNA



# SINTESI DELLE PROTEINE (TRASCRIZIONE)



# STRUTTURA RNA (m-RNA)

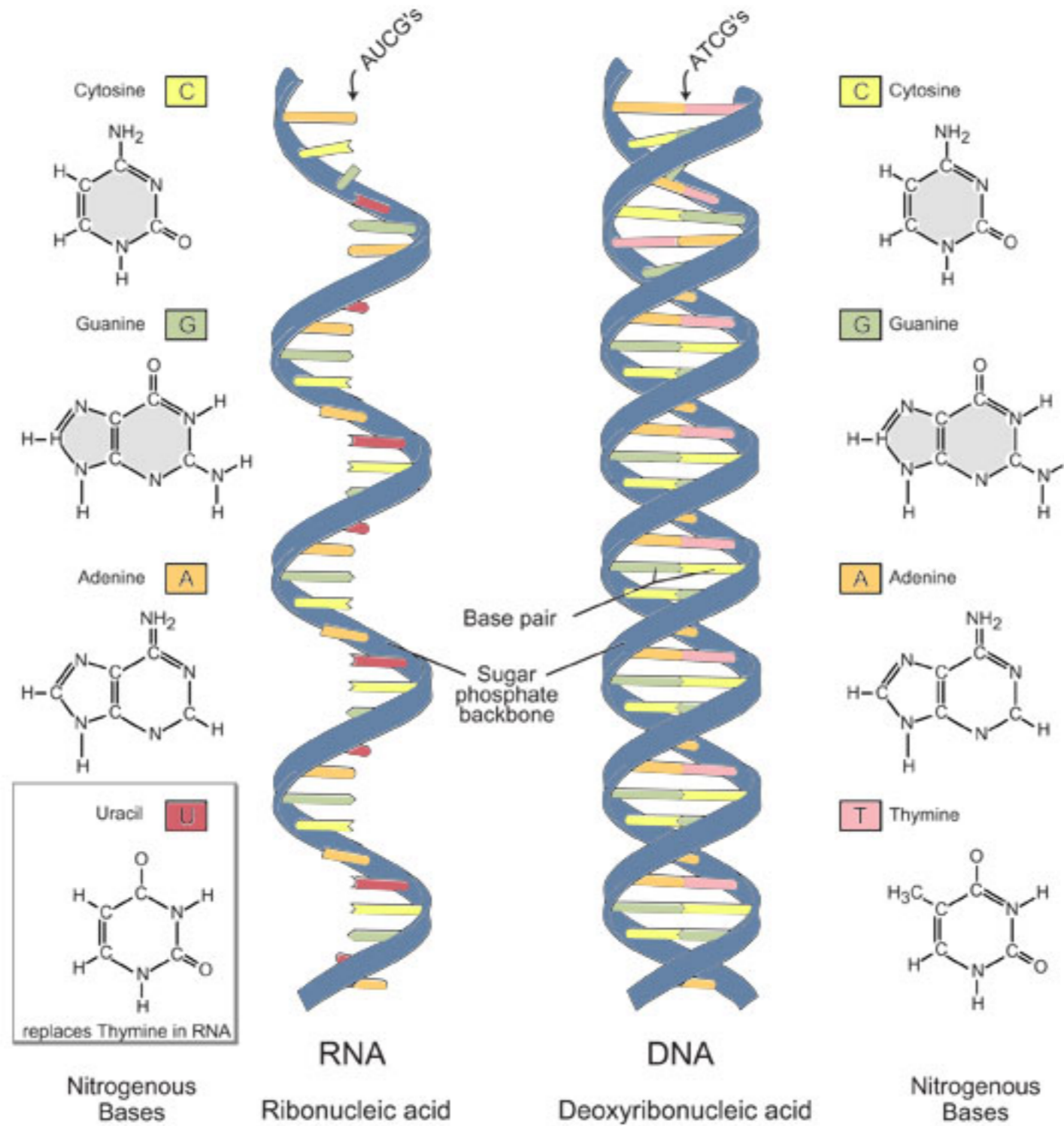
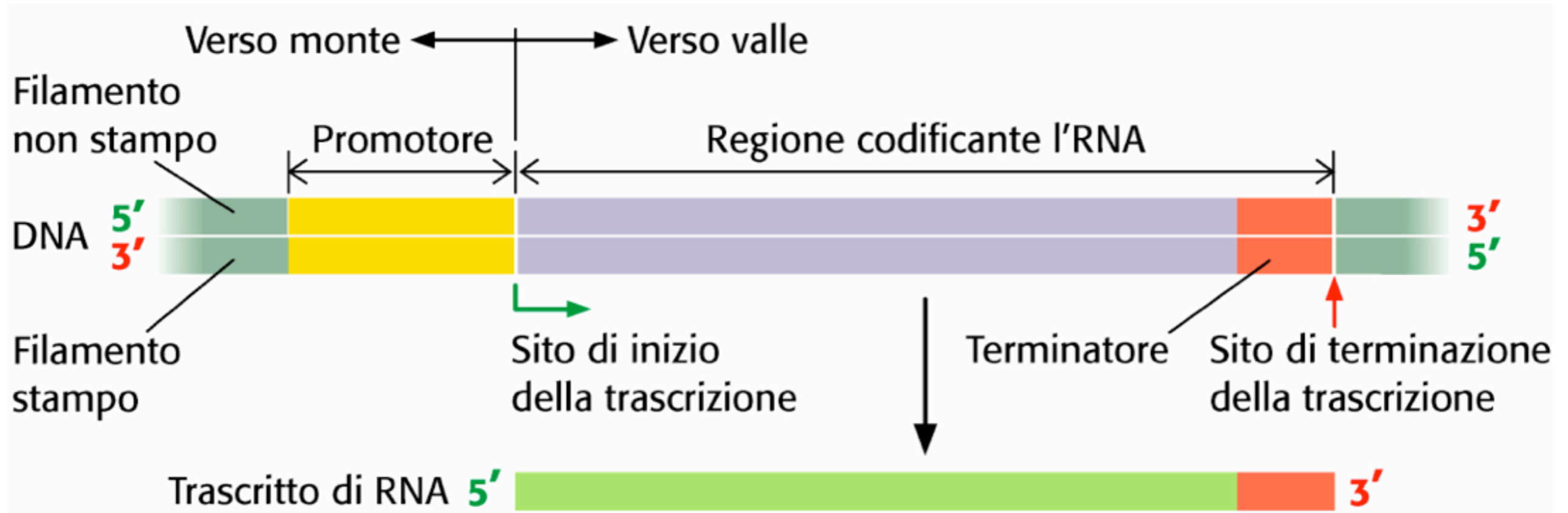


Image adapted from: National Human Genome Research Institute. Talking Glossary of Genetic Terms. Available at: [www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/rna.shtml](http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/rna.shtml).

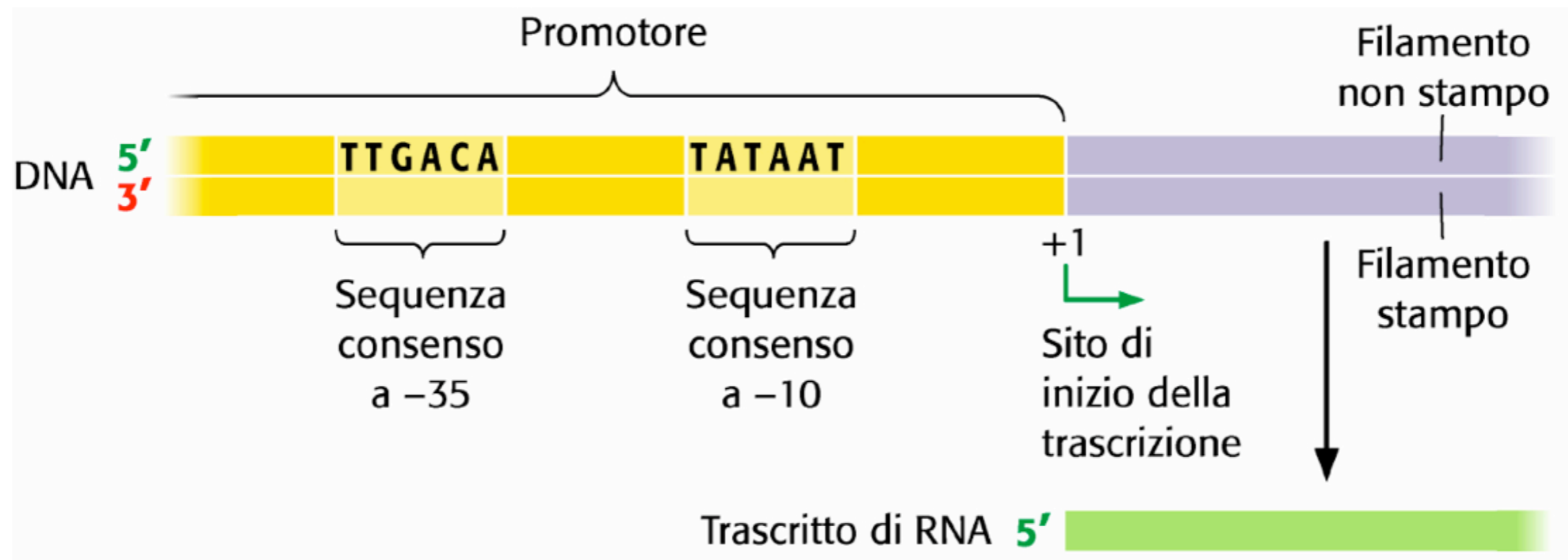
# L'unità di trascrizione



Il promotore è la regione del DNA che segnala:

1. quale dei due filamenti di DNA deve essere trascritto
2. qual è la direzione della trascrizione
3. qual è il sito di inizio della trascrizione

# I promotori dei geni di *E. coli*

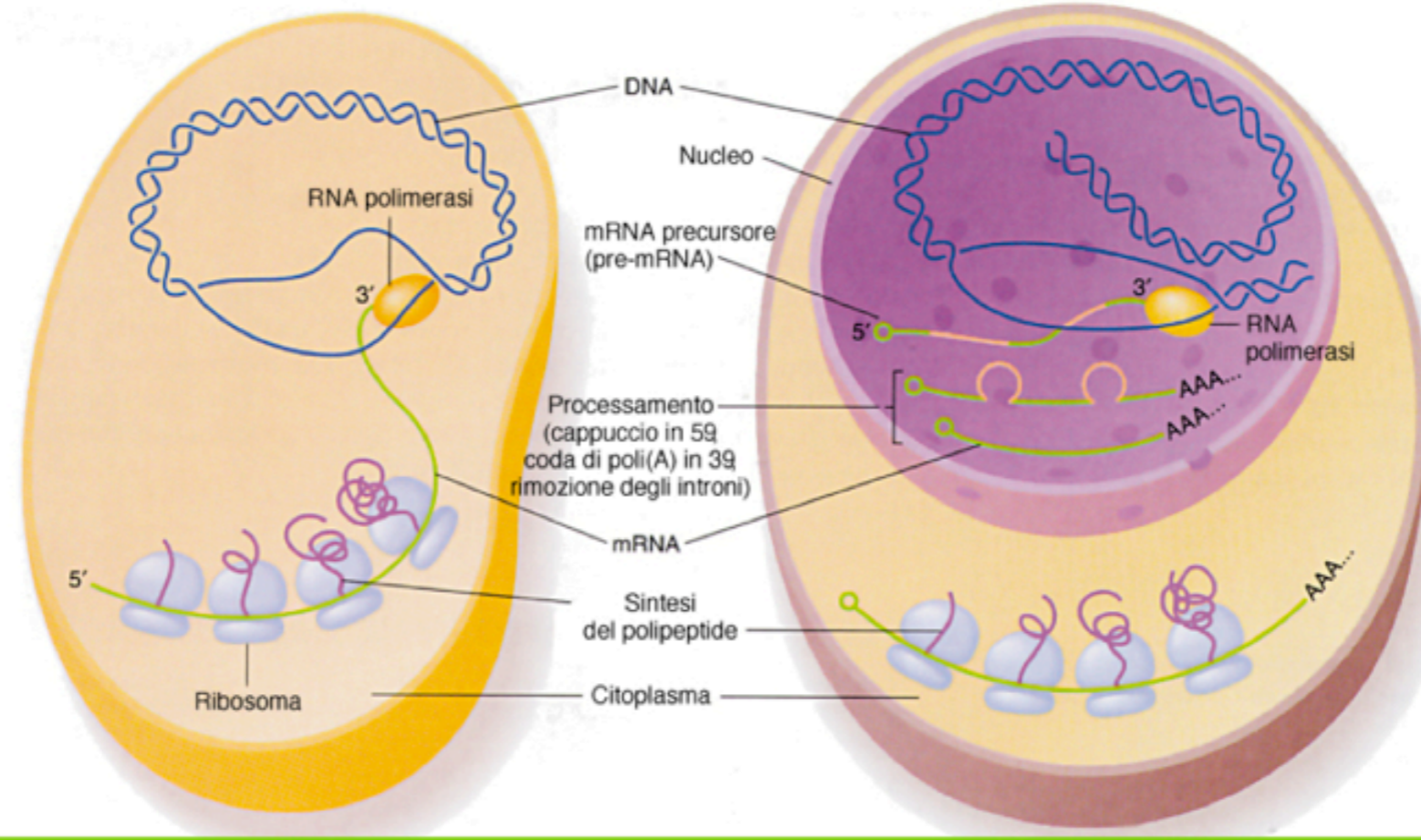


La sequenza consenso a -10 è detta anche Pribnow box

# Differenze nella trascrizione tra procarioti ed eucarioti

a) Procarioti

b) Eucarioti



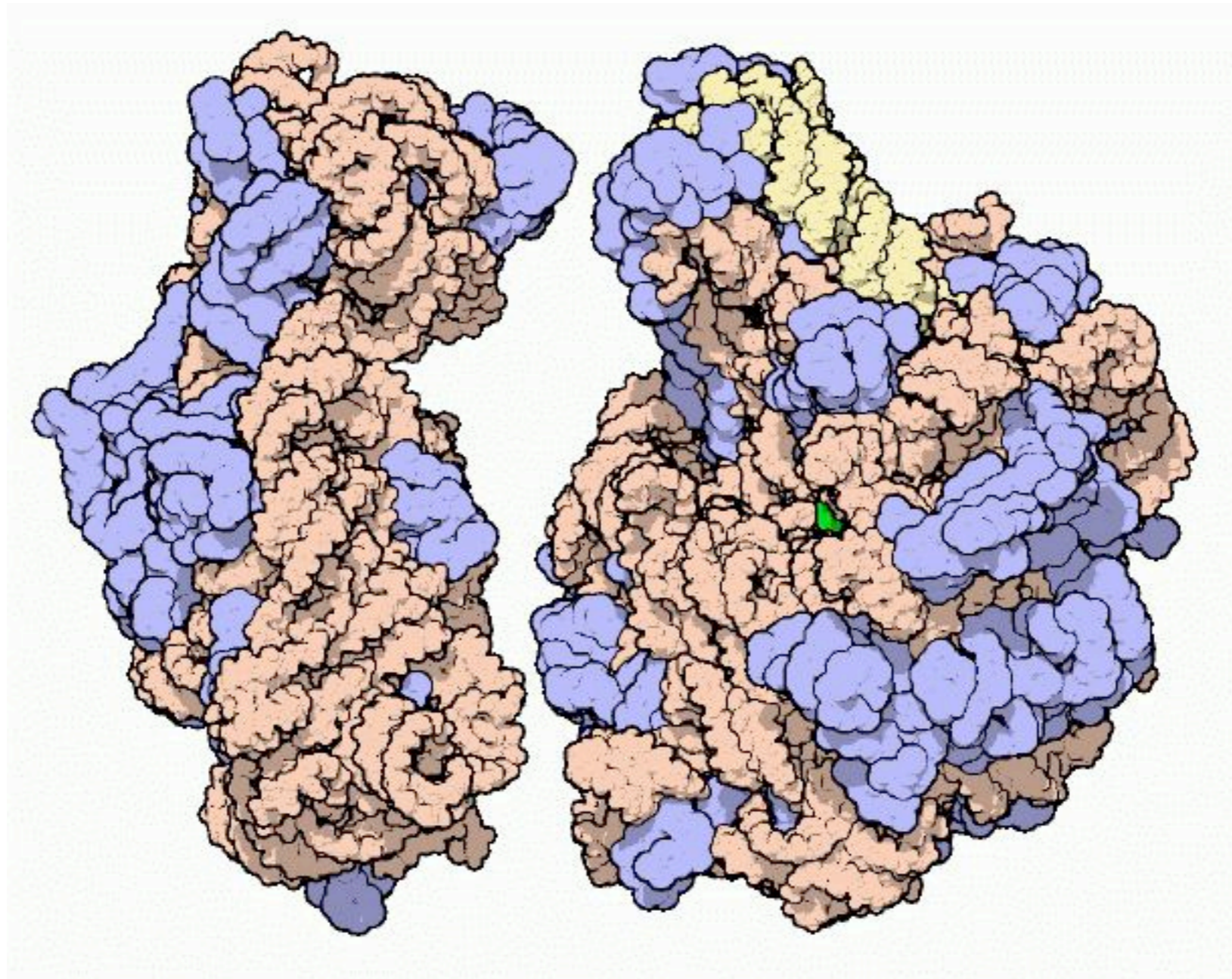
## Procarioti

## Eucarioti

1. Un unico tipo di RNA polimerasi
2. L'mRNA viene tradotto mentre la trascrizione è in corso
3. I geni non sono interrotti
4. Gli mRNA sono spesso policistronici

1. Tre diverse RNA polimerasi
2. L'mRNA viene maturato, trasportato nel citoplasma e poi tradotto
3. I geni contengono introni ed esoni
4. Gli mRNA sono monocistronici

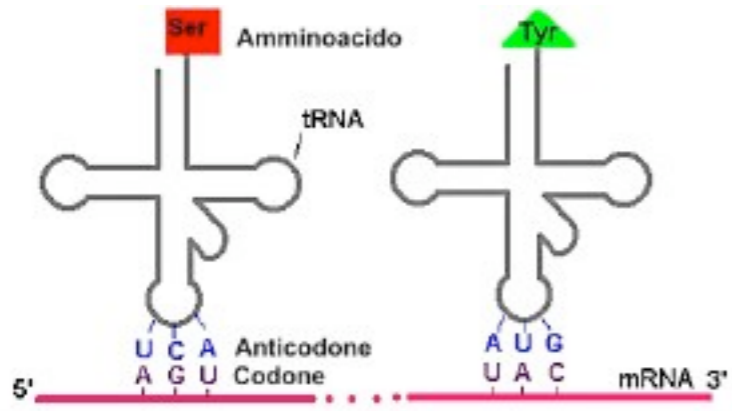
# RNA RIBOSOMIALE r-RNA



due filamenti associati a proteine: unità maggiore e minore del “Ribosoma”  
accoglie il m-RNA







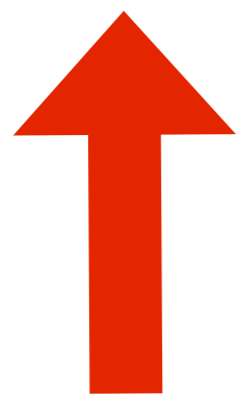
Seconda base del codone

	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U C A G
	Phe	Ser	Tyr	Cys	
	Leu	Ser	STOP	STOP	
	Leu	Ser	STOP	Trp	
C	Leu	Pro	His	Arg	U C A G
	Leu	Pro	His	Arg	
	Leu	Pro	Gln	Arg	
	Leu	Pro	Gln	Arg	
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U C A G
	Ile	Thr	Asn	Ser	
	Ile	Thr	Lys	Arg	
	Met	Thr	Lys	Arg	
G	Val	Ala	Asp	Gly	U C A G
	Val	Ala	Asp	Gly	
	Val	Ala	Glu	Gly	
	Val	Ala	Glu	Gly	

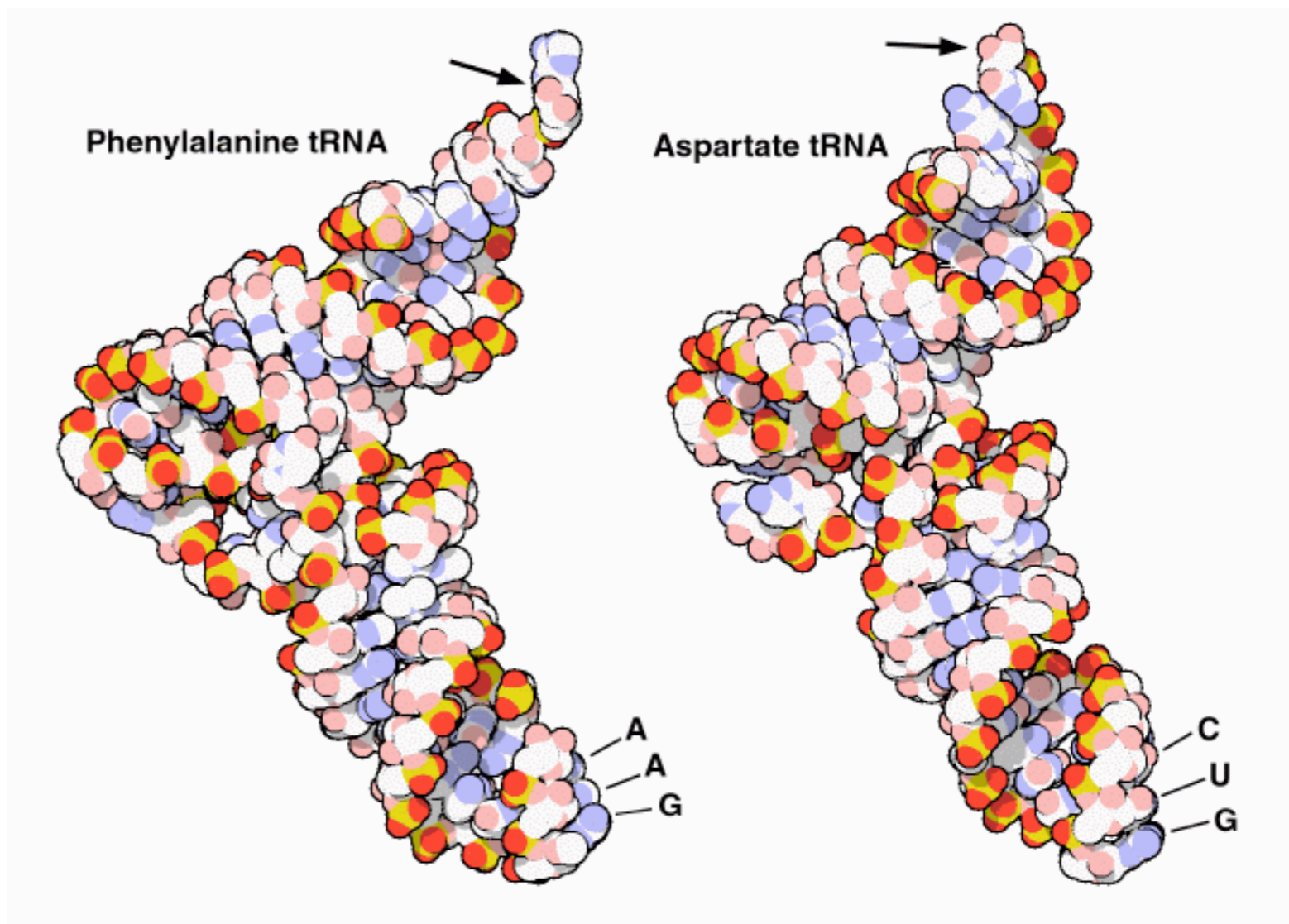
Prima base del codone

Terza base del codone

Tabella con i venti amminoacidi corrispondenti alle varie sequenze di codoni.

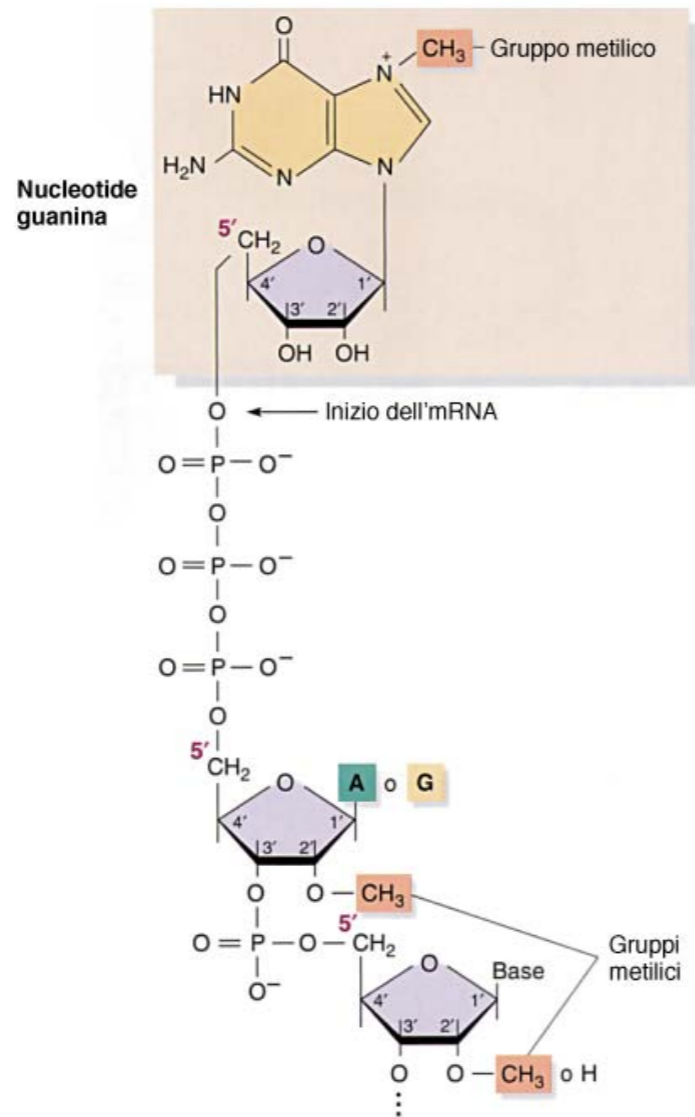


TRIPLETTE DEI  
CODONI  
CODIFICANTI  
GLI AA



# APPROFONDIMENTO

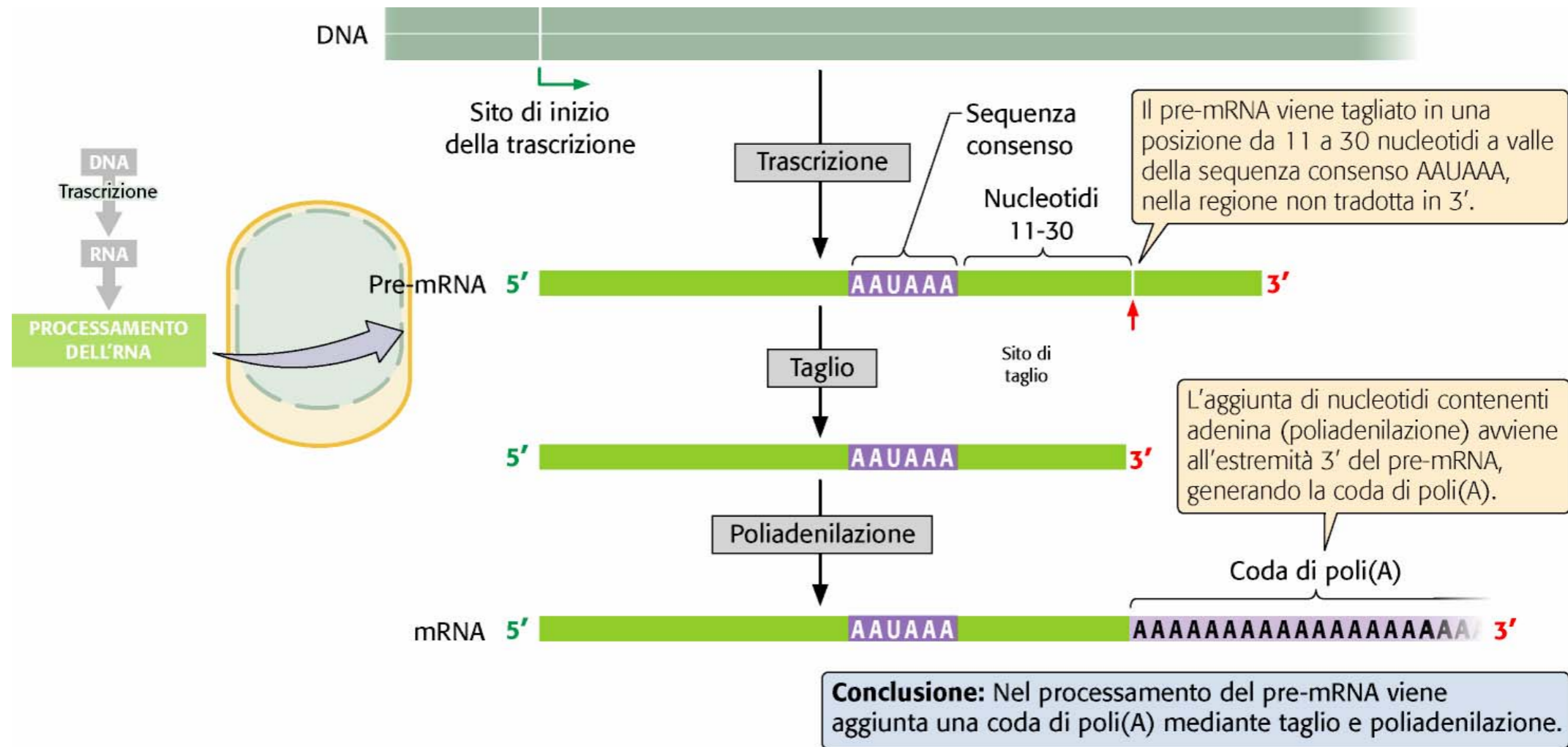
## Processamento dell'mRNA: aggiunta del cappuccio all'estremità 5'



la 7-metilguanossina è aggiunta all'estremità 5' del trascritto attraverso un legame covalente 5'-5'

Il cappuccio serve:  
-a proteggere l'mRNA dalla degradazione  
-A posizionare correttamente l'mRNA sui ribosomi

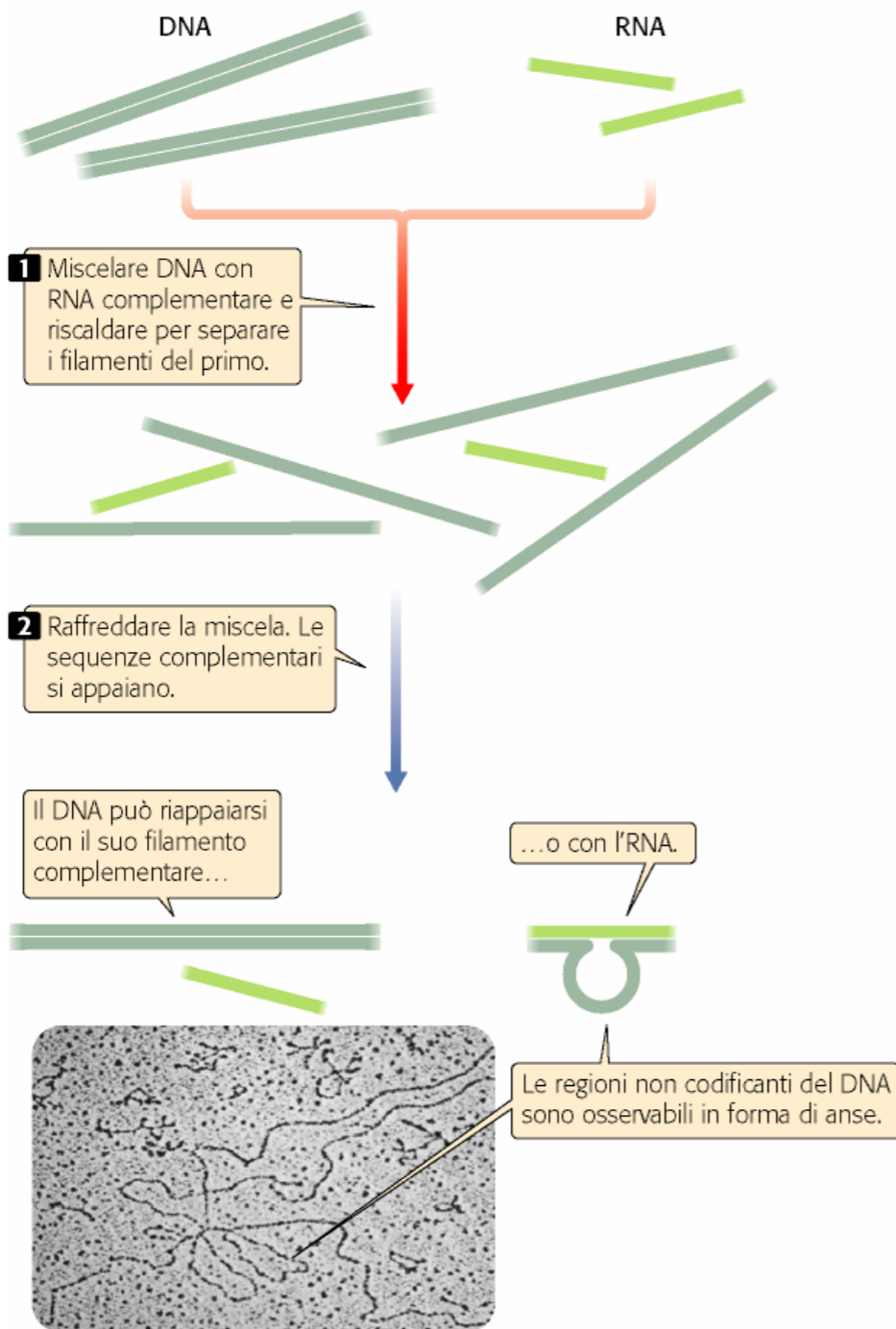
## Processamento dell'mRNA: aggiunta della coda di poliA all'estremità 3'



La lunghezza della coda di poliA aggiunta varia tra le 50 e le 200 adenine  
La coda di poli A conferisce stabilità agli mRNA

## Esperimento

**Domanda:** La sequenza codificante di un gene è sempre continua?



**Conclusione:** Le sequenze codificanti di un gene possono essere interrotte da altre non codificanti.

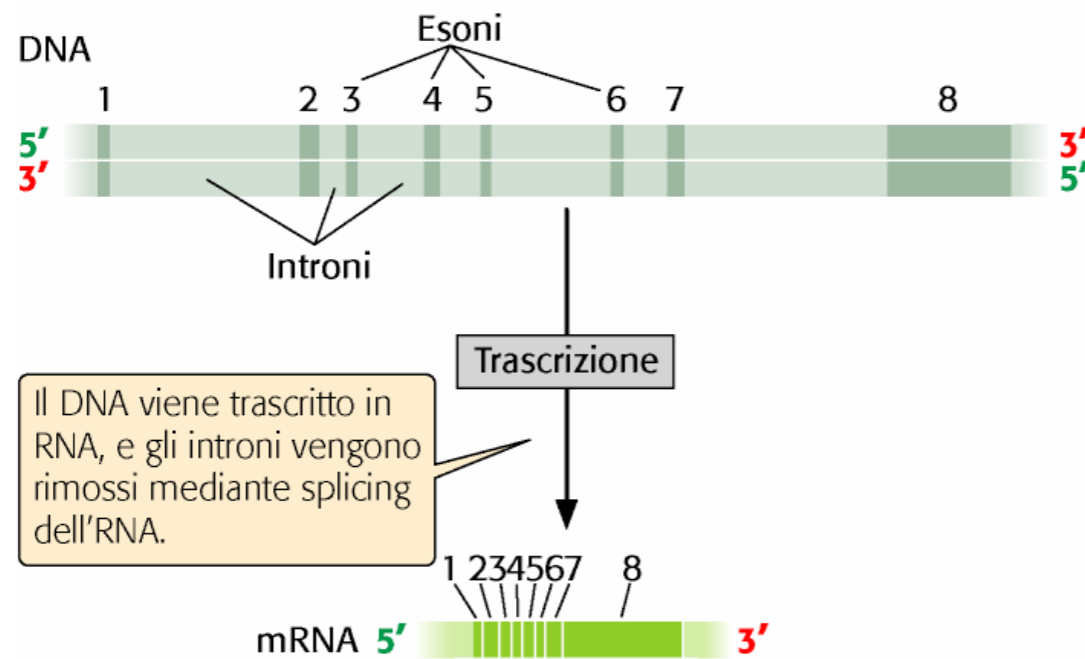
# Gli introni

Negli eucarioti la sequenza di un gene contenente introni e quella del suo mRNA maturo non sono colineari

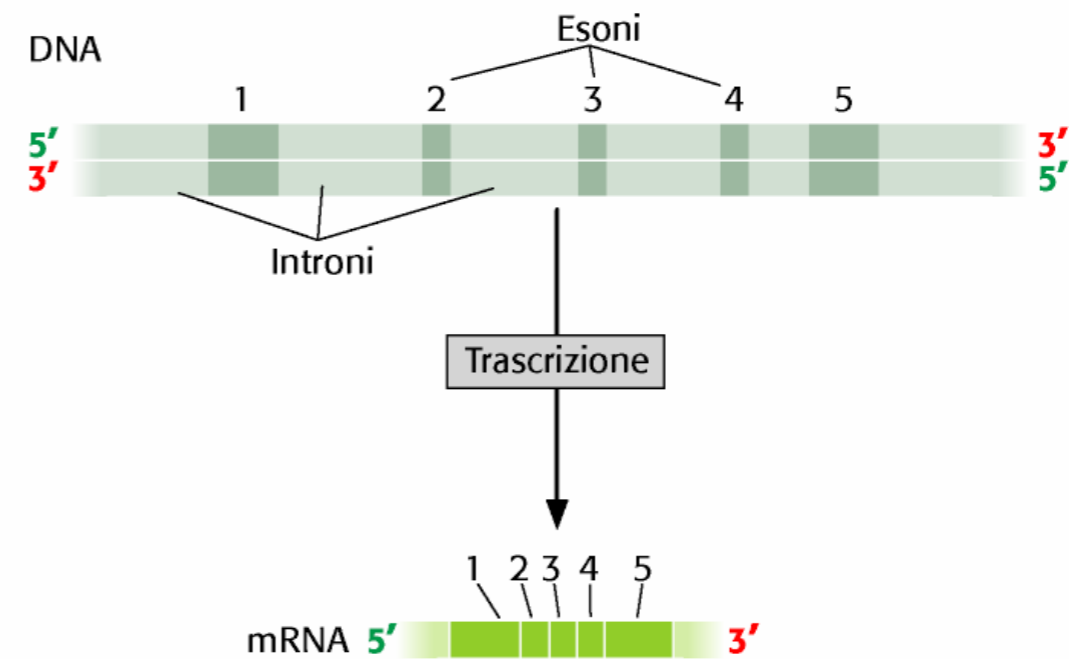
Gli introni sono sequenze di un gene che vengono trascritte in RNA, ma non vengono tradotte in proteine

# Caratteristiche degli introni

Gene della ovalbumina

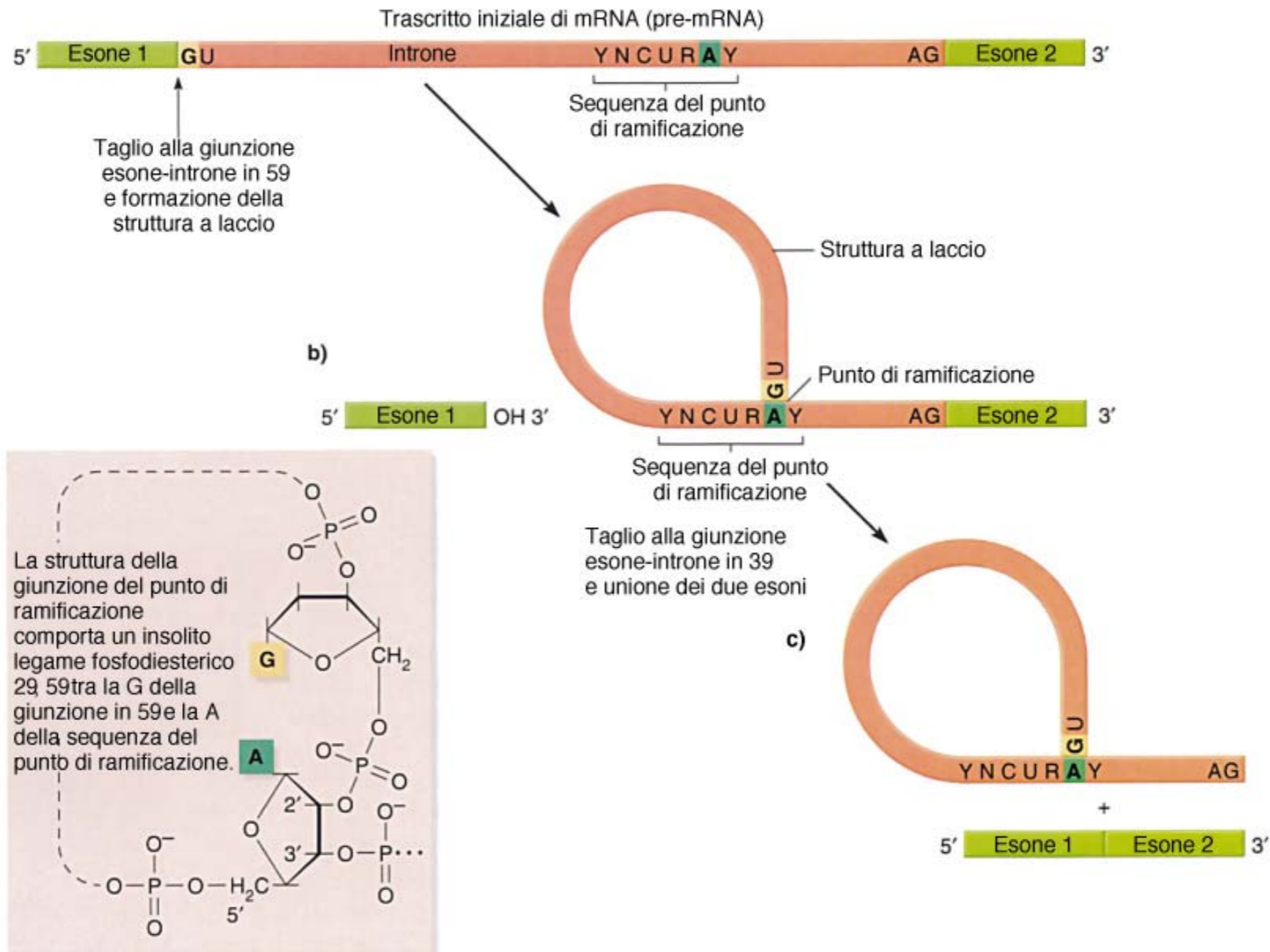


Gene del citocromo *b*

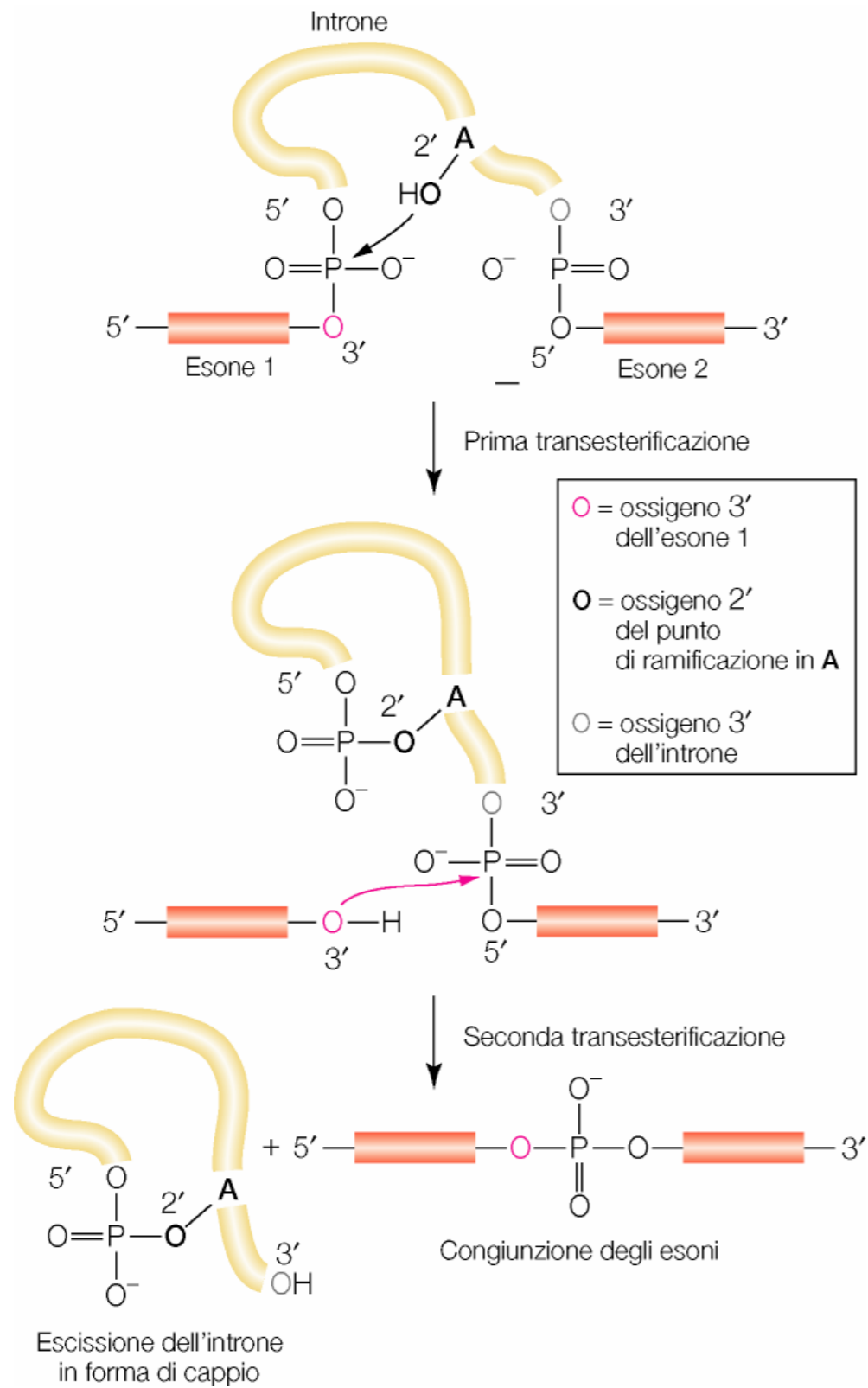


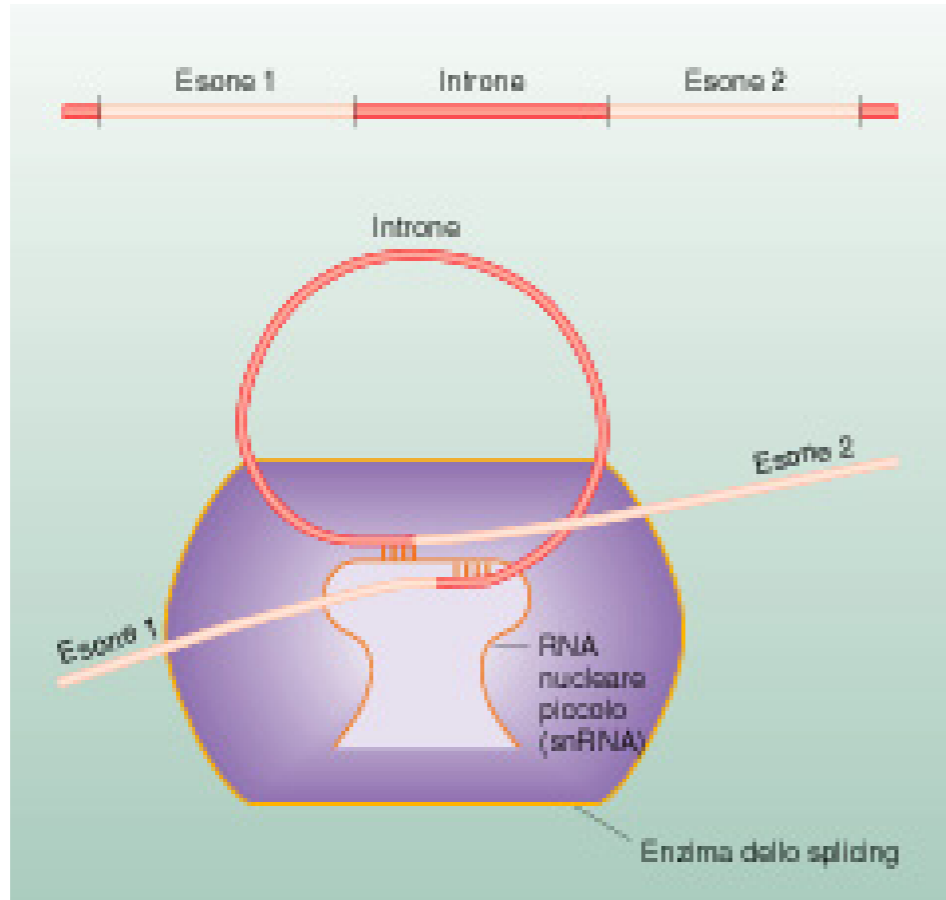
- Sono presenti quasi esclusivamente nei geni eucariotici
- Variano per numero (nell'uomo da 0 a 60)
- Variano per lunghezza (da 200 fino a 50000 nucleotidi)
- Sono in genere più lunghi degli esoni
- Negli eucarioti superiori il numero medio di introni per gene aumenta all'aumentare della complessità degli organismi

# Processamento dell'mRNA: Rimozione degli introni e giunzione degli esoni

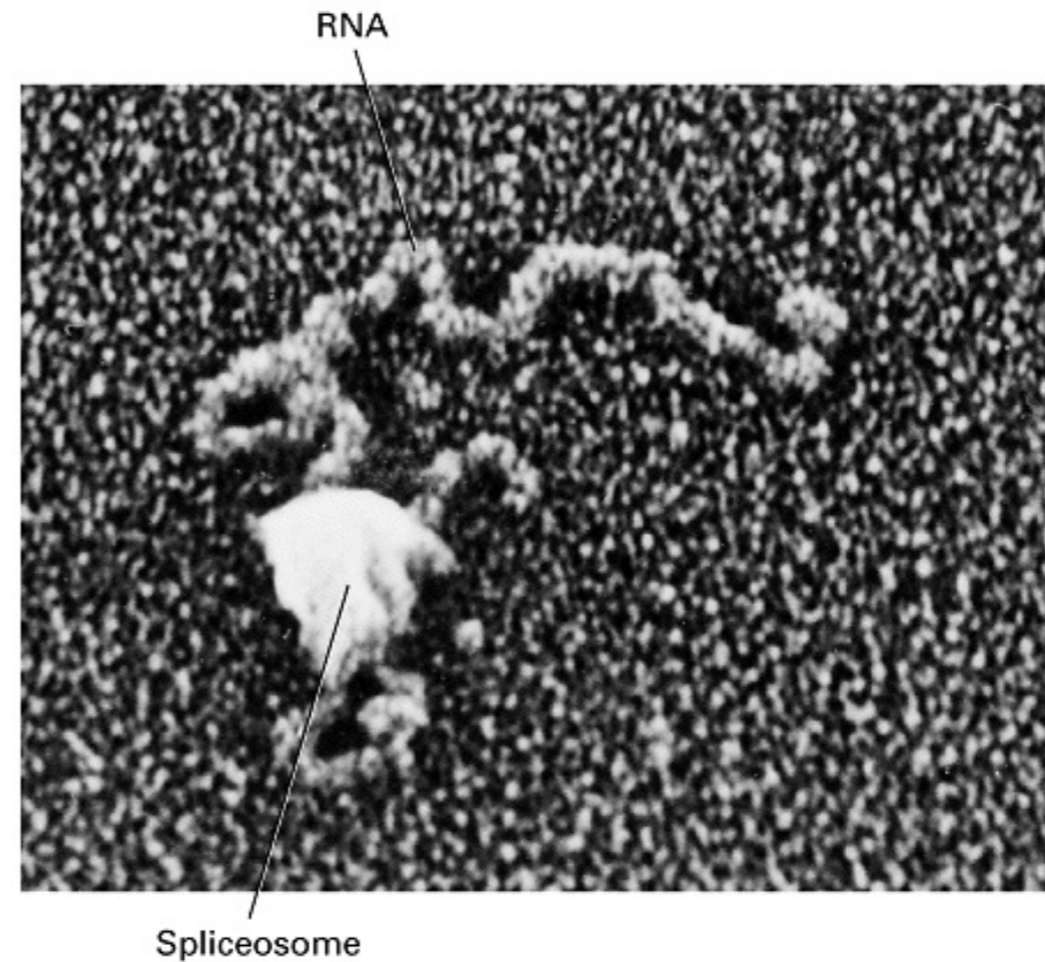


# Reazioni di transesterificazione nello splicing





## Lo spiceosoma



snRNP: small nuclear ribonucleoprotein particles,  
costituite da proteine e cinque snRNA (U1, U2, U4, U5 e U6)



# ESEMPIO

## Sequenza nucleotidica del gene dell'interleuchina umana

5' ...CATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTCAGACAGGTAAGTCTTTGAAAATATGTGTAATATGTAAAACATTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAACAG **TATAAAT** GCATCTCTTG

TCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACA **ATG** TACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGCACCTACTTCAA

GTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTACTTCTGGATTACAGATGATTTGAATGGAATTAATGTAAGTATATTTCTTTCTTACTAAAATTATTACATTTAGTAATCTAGCTGGAGATCATTCT

TAATAACAATGCATTATACTTTCTTAGAATTACAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGTAAGTACAATATTTATGTTCAATTTCTGTTTTAATAAAATTCAAAGTA

ATATGAAAATTTGCACAGATGGGACTAATAGCAGCTCATCTGAGGTAAGAGTAACTTAATTTGTTTTTTGAAAACCCAAGTTGATAATGAAGCCTCTATTAACAGTTTACCTATATTTTAAATATATATT

GTGTGTTGGTGGGGGTGGGAAGAA- - (+2400bp)- - -TGCAGAAAGTCTAACATTTTGCAAAGCCAAATTAAGCTAAAACCAGTGAGTCAACTATCACTTAACGCTAGTCATAGGTACTTGAGCCCTAGTTTT

TCCAGTTTATAATGTAAACTCTACTGGTCCATCTTTACAGTGACATTGAGAACAGAGAGAATGGTAAAAACTACATACTGCTACTCCAATAAAAATAAATTGGAAATTAATTTCTGATTCTGACCTCTATGTAAA

CTGAGCTGATGATAATTATTATTCTAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACT

TAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTCGAACTAAAGGTAAGGCATTACTTTATTTGCTCTCCTGGAAATAAAAAAAAAAAAAAGTAGGGGGAAAAGT----(+1900 BP)-----CTTGAAAATAAAGGCAACAGGCCTA

TAAGACTTCAATTGGGAATAACTGTATAAGGTAAACTACTCTGTACTTTAAAAAATTAACATTTTCTTTTATAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTT

CTGAACAGATGGATTACCTTTTGTAAAGCATCATCTCAACACTGACT **TGA** TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAAACATATCAGGCCTTCTATTATTAAATATTTAAATTTATATTTATTGTTGAATGTATGGTTT

GCTACCTATTGTAACCTATTATTCTTAATCTTAAAACATAAATATGGATCTTTTATGATCTTTTTGTAAGCCCTAGGGGCTCTAAAAAGTTTCACTTATTATCCCAAATATTTATTTATTATGTTGAATGTTAAATA

TAGTATCTATGTAGATTGGTTAATAAACTATT **TAATAAA** TTTGATAAATATAAACAAGCCTGGATATTGTTATTTTGGAAACAGCAGAGTAAGCATTAAATATTTCTTAGTTACTTGTGTGAACTGTAGGATG

GTTAAAATGCTTACAAAAGCACTCTTCTCTGAAGAAATATGTAGAACAGAGATGTAGACTTCTCAAAGCCCTTGCTTT **3'**

**TATA box** (TATAAAT)

**Sito di inizio della trascrizione** (→)

**Codone di inizio** (ATG)

**Esoni 1, 2, 3, 4**

**Introni 1, 2, 3**

**Codone di terminazione** (TGA)

**Sequenza consenso per il poli(A)** (TAATAAA)

**Sito di taglio in 3'** (↑)

È possibile osservare che gli introni non codificanti occupano gran parte dei geni, tenendo anche conto del gran numero di basi che non sono state rappresentate.

Gli esoni codificano per meno di 165 amminoacidi, ossia una proteina piccola.

# GENETICA BATTERICA

GENOTIPO



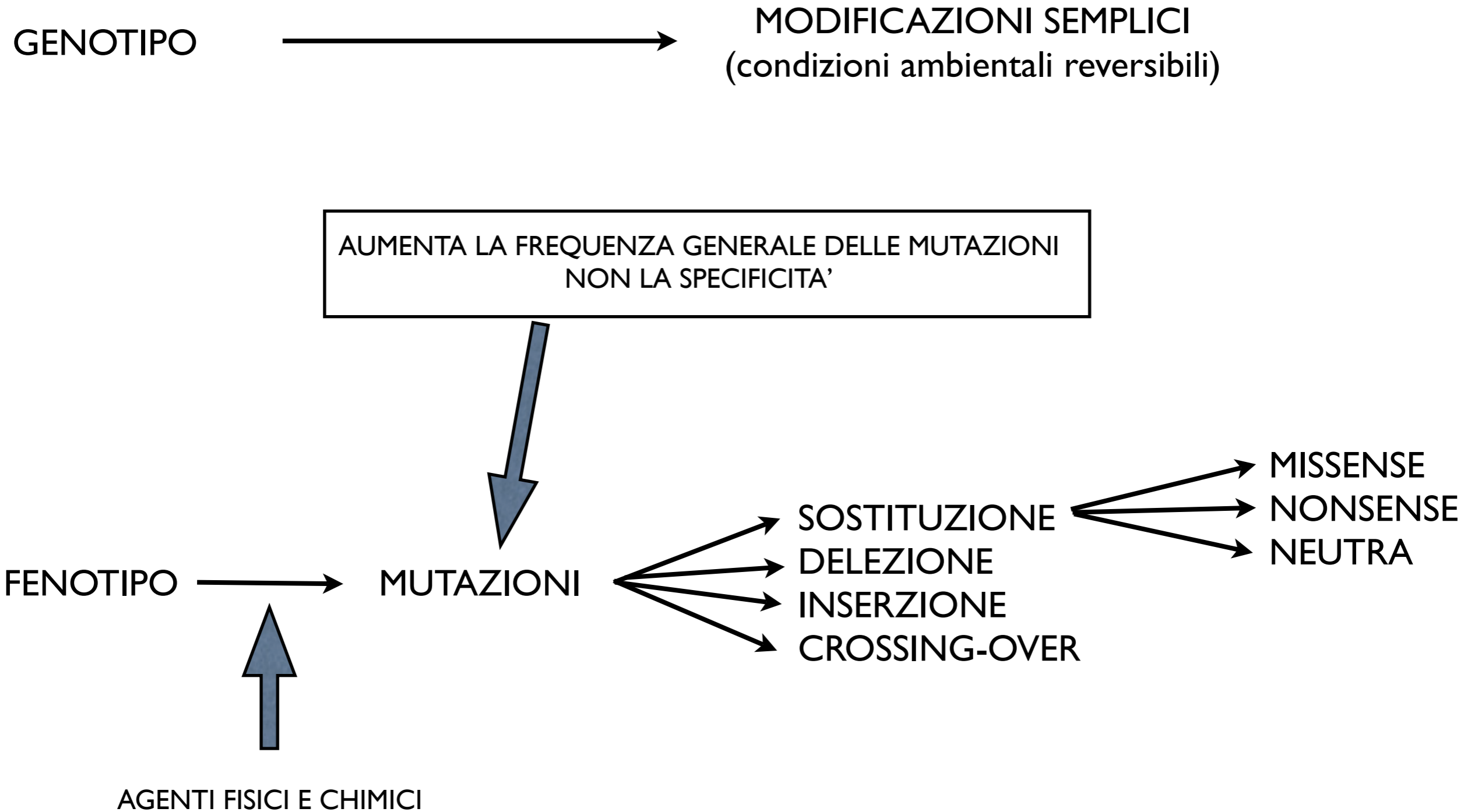
Complesso di geni  
di un organismo

FENOTIPO



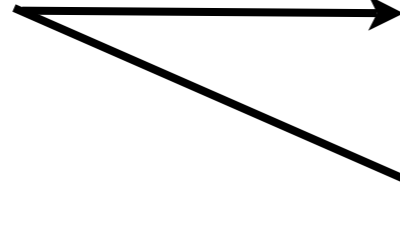
parte del corredo genetico  
che viene effettivamente  
espresso

# MODIFICA DEL CODICE GENETICO



# ALTRI METODI DI MODIFICA DEL CORREDO GENETICO

TRASFORMAZIONE



CROSSING-OVER

Trasferimento di DNA libero da un batterio all'altro

Introduzione di vettori con DNA esogeno

CONIUGAZIONE



Organismi in cui c'è differenziazione sessuale (Cellule gameti)  
(Donatori-Acettori)

TRASDUZIONE



Introduzione di virus (Batteriofagi o Fagi)  
(Ciclo Litico o integrazione del gene)

FUSIONE CELLULARE

# MANIPOLAZIONE DEI GENI

## ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Enzimi specifici: taglio elica in posizione specifica

TIPO I taglio in modo casuale

TIPO III Taglio preciso ma con metilazione delle basi

TIPO II Taglio su sequenza specifica

## Isoschizomeri e Isocaudameri

### Isoschizomeri

Sebbene gli enzimi di restrizione isolati siano oltre 3500, le sequenze bersaglio che possono essere tagliate sono molte di meno (appena più di duecento). E' evidente che molti enzimi isolati da batteri diversi hanno la stessa specificità di sequenza, sono cioè **isoschizomeri**.

#### Esempi:

<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>
<i>HpaI</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>MspI</i>	<i>Moraxella species</i>

riconoscono e tagliano tutti la stessa sequenza C|CGG

<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCC GGG
<i>XmaI</i>	<i>Xantomonas malvacearum</i>	C CCGGG

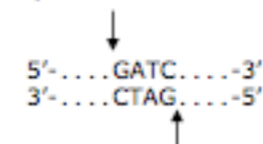
riconoscono la stessa sequenza, ma tagliano in modo diverso.

### Isocaudameri

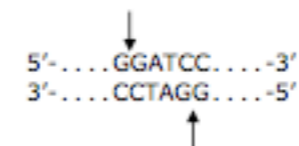
Talvolta si usa il termine **isocaudameri** per indicare enzimi di restrizione che riconoscono sequenze bersaglio diverse, ma che tagliano producendo estremità identiche.

#### Esempio:

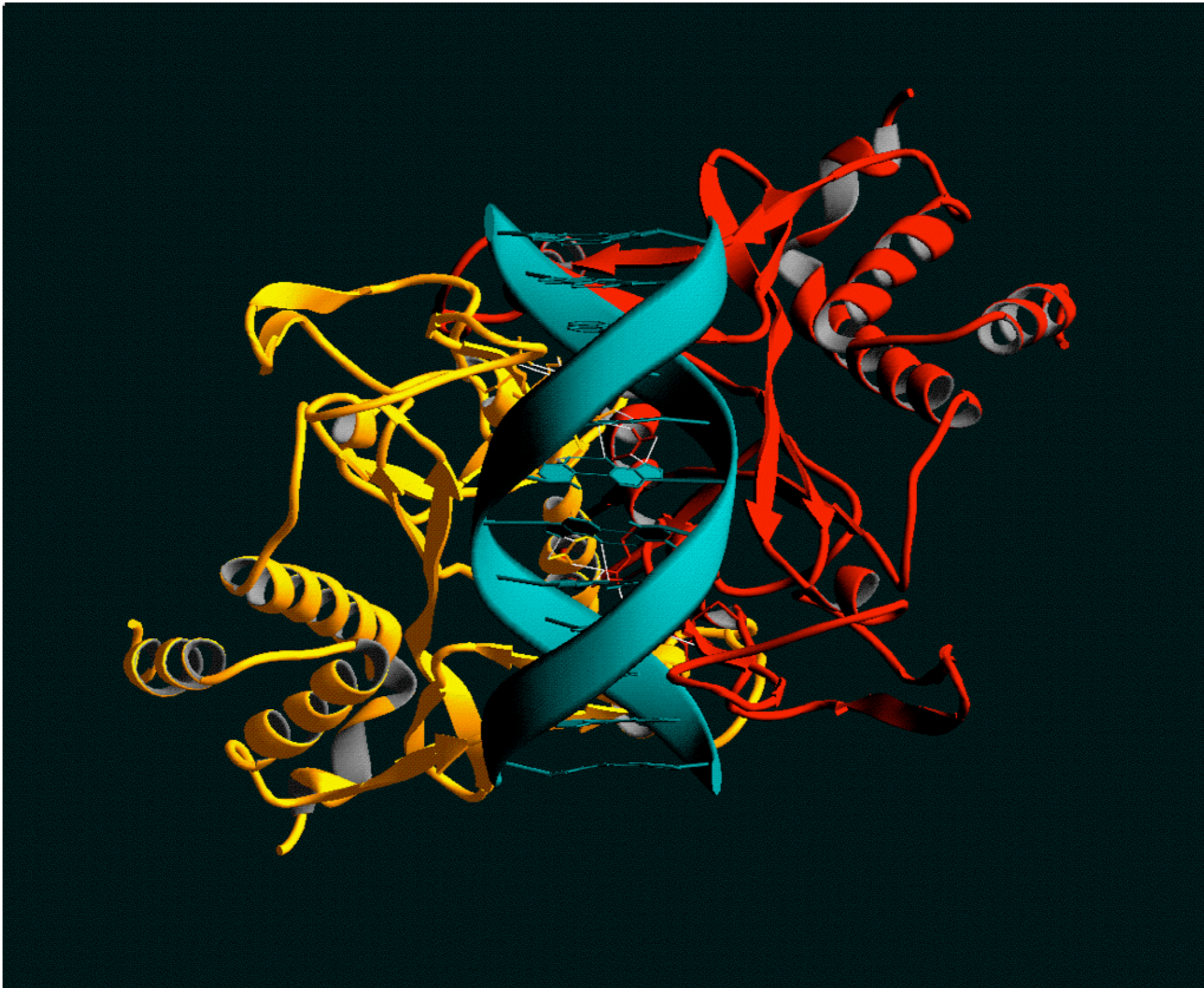
Gli isoschizomeri *MboI* e *Sau3A* riconoscono la sequenza di quattro basi:



Mentre *BamHI* riconosce una sequenza di sei basi:



ECO RI (ROSSO E GIALLO) CHE OPERA UN TAGLIO SULLA  
DOPPIA ELICA DEL DNA (IN BLU)



# ALCUNE ENDONUCLEASI

Enzima	Organismo di origine	Sequenza consenso	Taglio
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5'---GAATTC---3' 3'---CTTAAG---5'	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'---GGATCC---3' 3'---CCTAGG---5'	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'---AAGCTT---3' 3'---TTCGAA---5'	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'---TCGA---3' 3'---AGCT---5'	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'---AGCT---3' 3'---TCGA---5'	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'

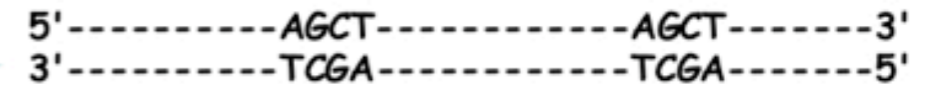
# Analisi di restrizione: un esempio...

DNA individuo 1



PCR

Amplificazione di un frammento di DNA con 2 siti di taglio per l'enzima Alu I



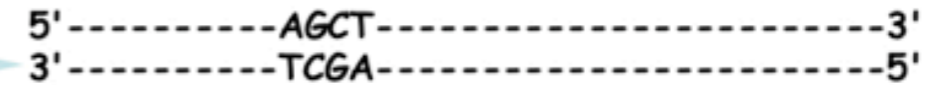
Lunghezza: 242 bp

DNA individuo 2



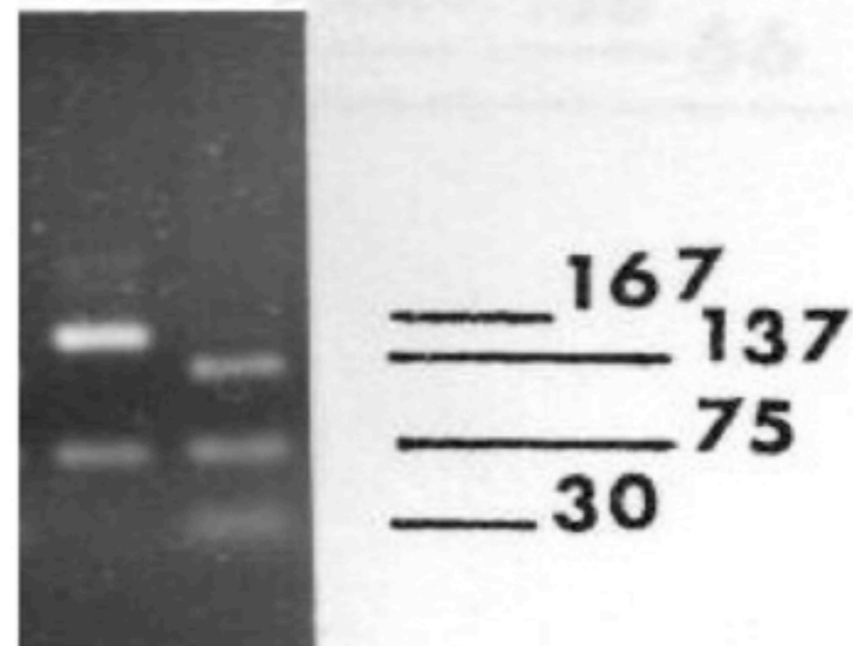
PCR

Amplificazione di un frammento di DNA con 1 sito di taglio per l'enzima Alu I



Lunghezza: 242 bp

Individuo 2 Individuo 1

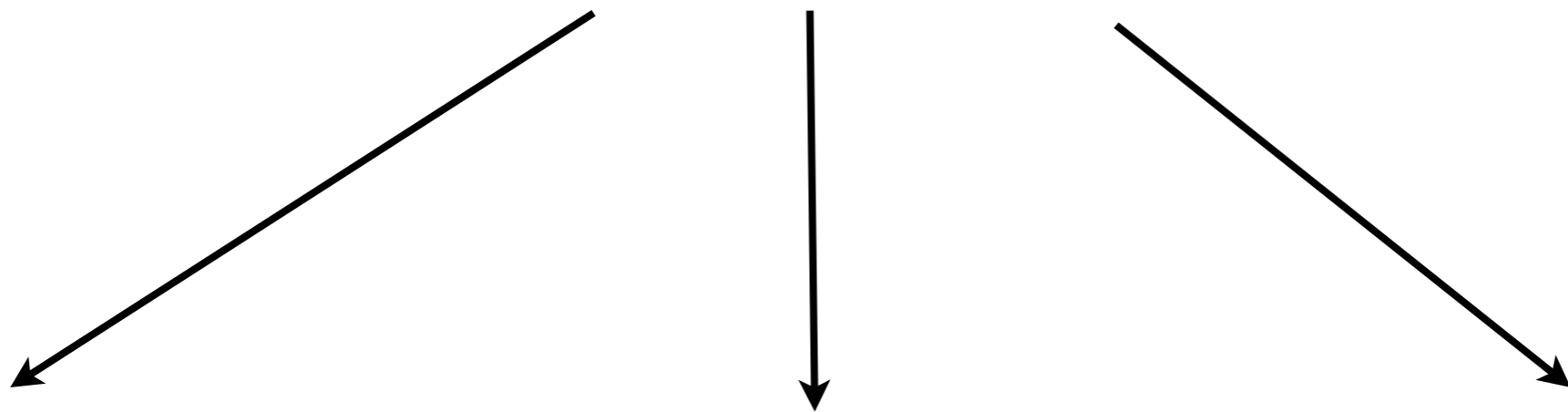


Digestione dei frammenti con l'enzima Alu I



# VETTORI

Accogliere DNA esogeno  
Penetrare facilmente nella cellula ospite  
Contenere un marker che ne permetta il riconoscimento  
Avere uno o più siti di riconoscimento per le endonucleasi



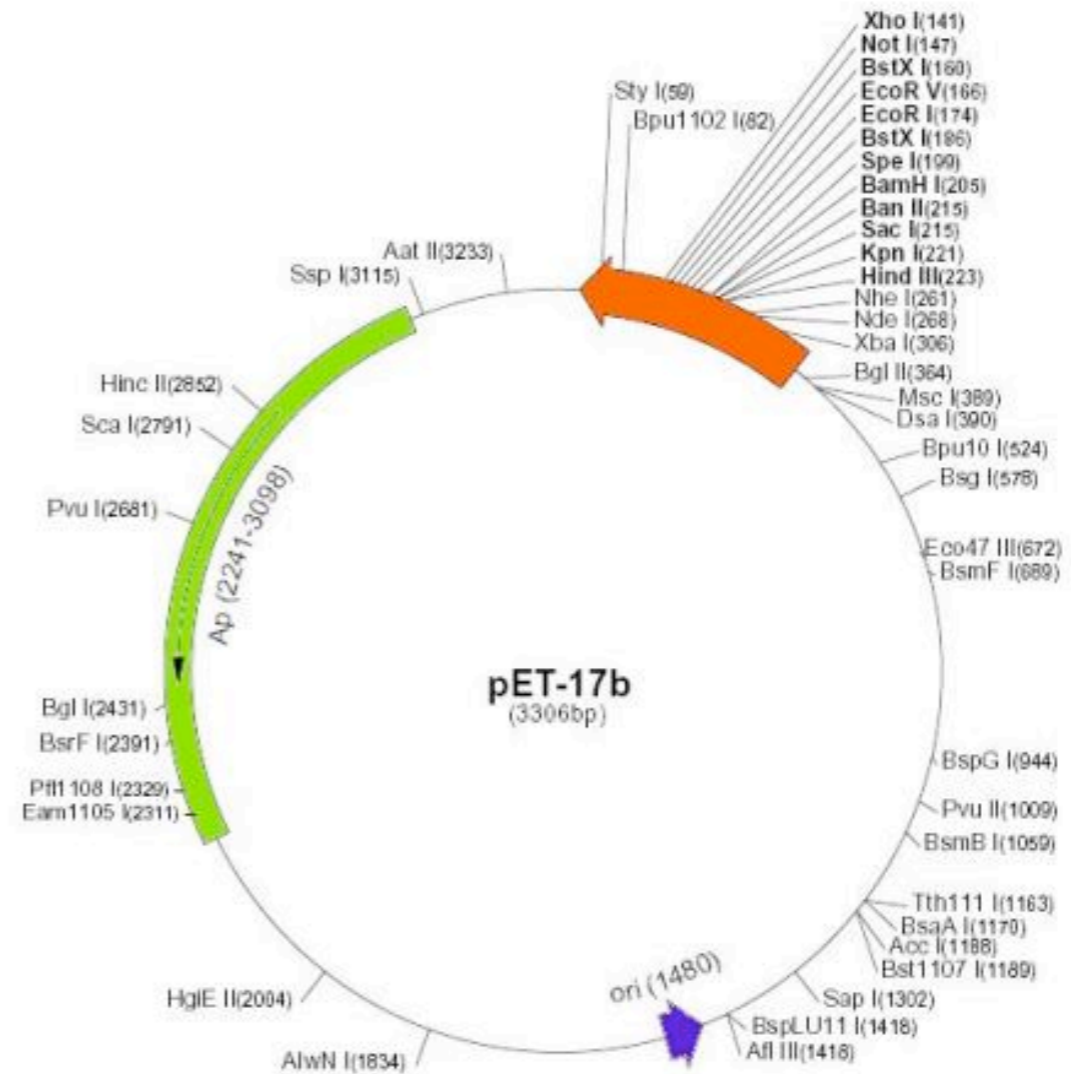
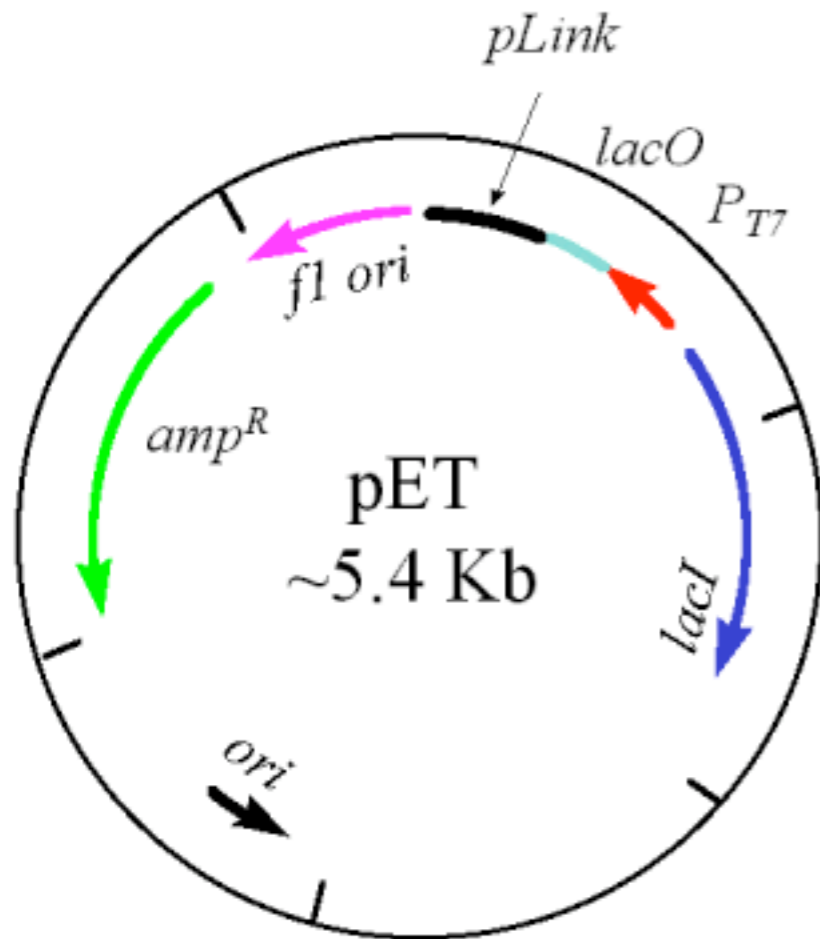
PLASMIDI

FAGI

COSMIDI

Ibridi dei precedenti

# ESEMPIO: IL PLASMIDE pET-17b



Nello specifico, il sistema pET è un plasmide usato per veicolare geni e produrre proteine in un batterio. Il plasmide porta i geni dell'operone lac (servono a regolare la trascrizione), il promotore che in questo caso è specifico per l'RNA polimerasi T7, poi c'è l'origine di replicazione f1 ed altri geni.

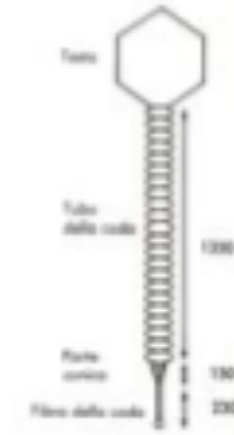
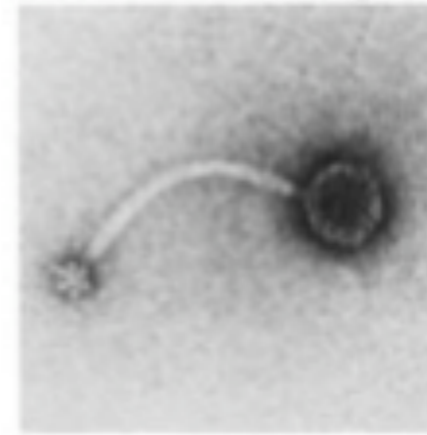
il gene che si vuol far esprimere è stato clonato nel plasmide (si trova nel sito pLink). La polimerasi T7 può trascrivere il gene riconoscendo il promotore T7, che è un promotore virale molto forte. Naturalmente, il gene non verrà trascritto se non c'è la polimerasi T7, la quale non è prodotta dalle cellule procariotiche e quindi per far funzionare il sistema è molto importante che all'ospite venga fornita anche questa polimerasi. (cioè, fornire il gene della polimerasi).

Il vantaggio del sistema è che si può controllare l'espressione del gene e per fare questo si usa il sistema lac incorporato nel plasmide pET.

# FAGO LAMBDA

## Il fago $\lambda$ come vettore

Microfotografia al microscopio elettronico e schema del batteriofago  $\lambda$ .

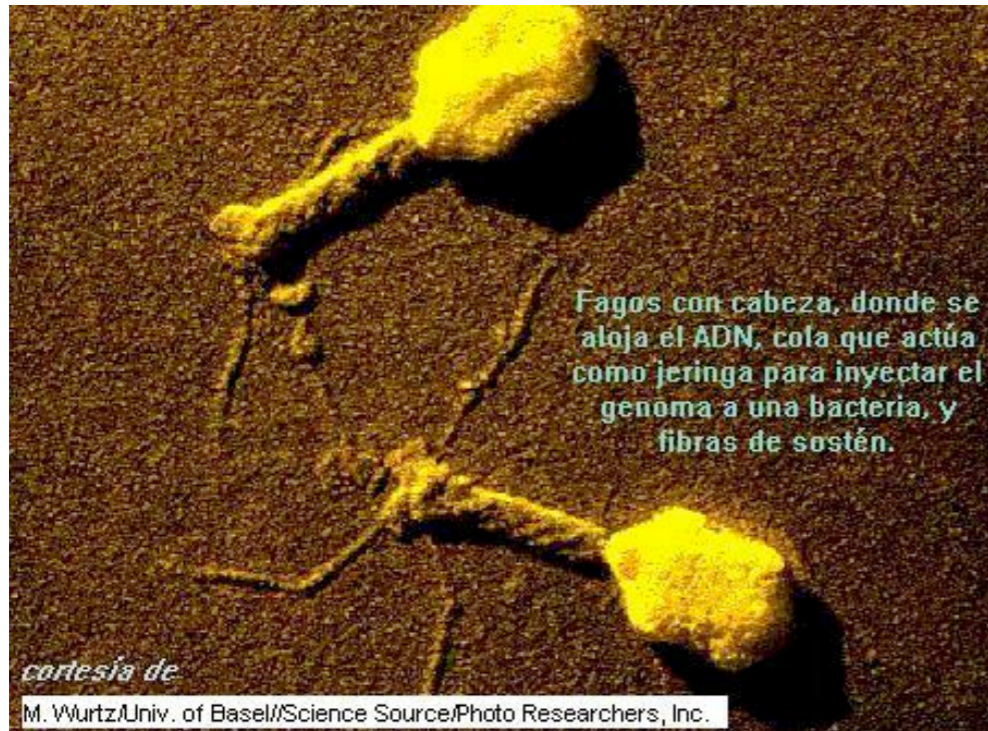


Il virus batterico  $\lambda$ , scoperto nel 1951, è rappresentativo dei fagi temperati di *E. coli* (es.  $\Phi$ 80, P2).

Il profago integrato nel genoma si libera in seguito a danni del DNA. Prolifera a spese dell'ospite e lisa la cellula infetta liberando circa 100 virioni.

## Veicolo ideale per clonare il DNA genomico

- Le placche di lisi sono più piccole delle colonie batteriche: è possibile analizzare e caratterizzare migliaia di placche sulla stessa piastra.
- L'efficienza di infezione delle particelle fagiche è superiore all'efficienza di trasformazione dei batteri con DNA nudo.
- Si possono inserire pezzi di DNA di maggiori dimensioni: fino a 23 Kb (lucido 6-4).
- Il sistema di impacchettamento *in vitro* delle particelle fagiche permette una selezione per grandezza del DNA.
- Una "libreria" di milioni di particelle fagiche, ciascuna con un pezzo di DNA diverso, si conserva facilmente in un tubo da centrifuga da 1,5 millilitri.

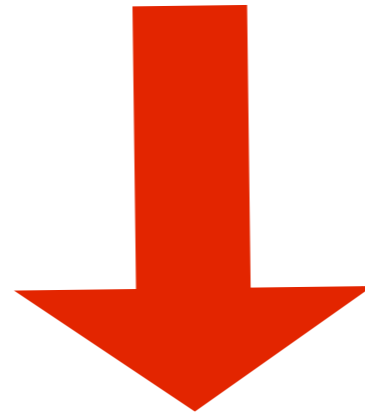


Fagos con cabeza, donde se aloja el ADN, cola que actúa como jeringa para inyectar el genoma a una bacteria, y fibras de sostén.

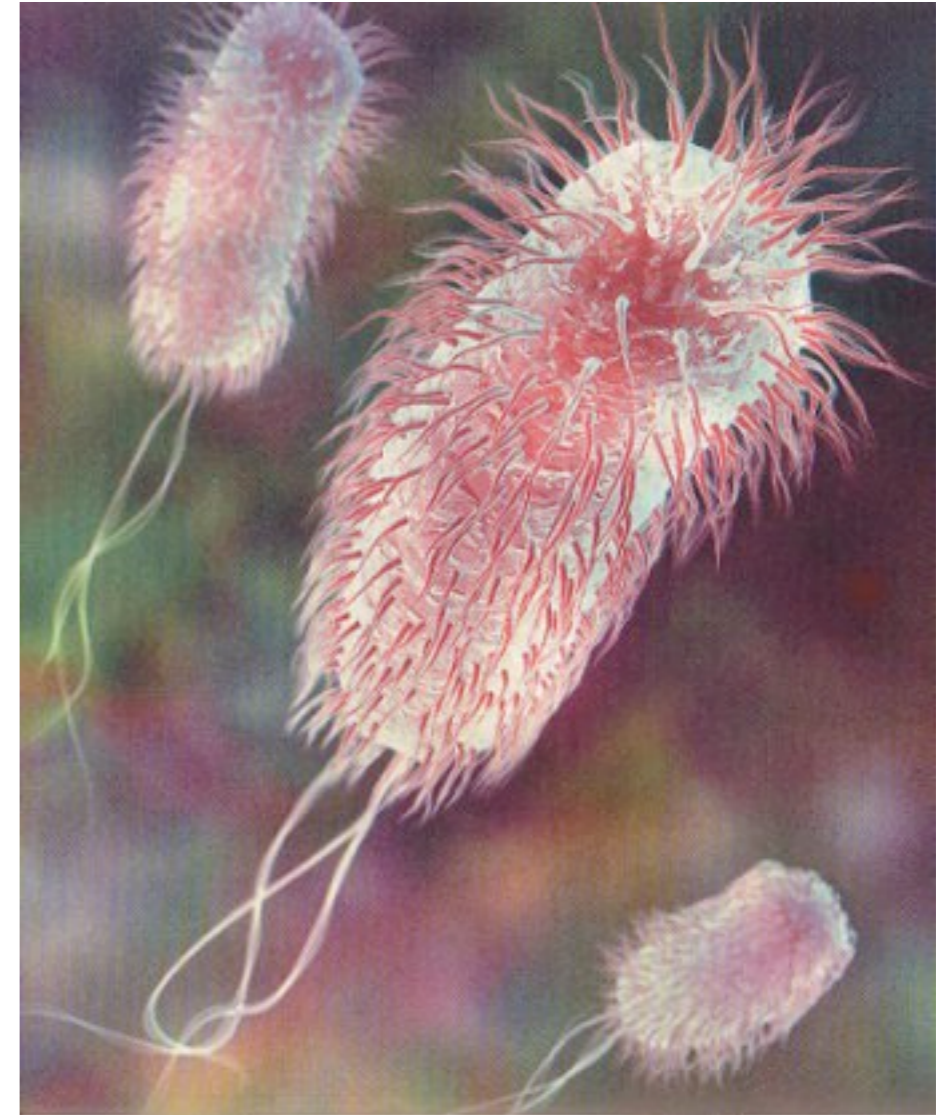
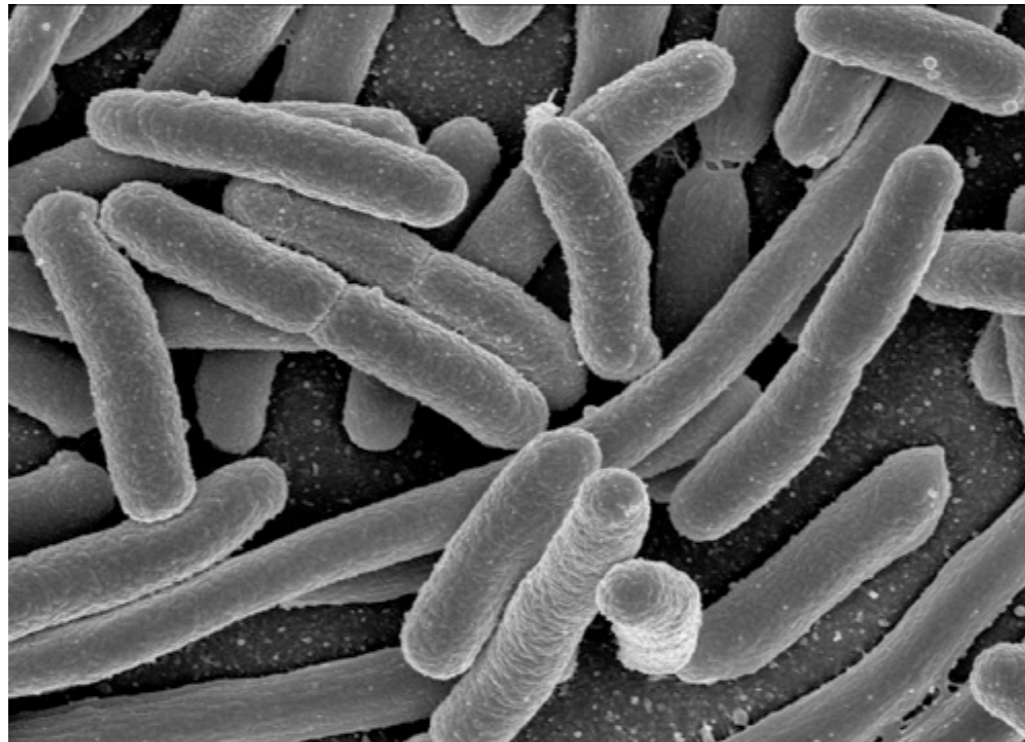
cortesía de

M. Wurtz/Univ. of Basel/Science Source/Photo Researchers, Inc.

# ORGANISMI OSPITI



E. COLI



## CARATTERISTICHE DI E.COLI

- Utilizzato da più di 50 anni come organismo modello per la ricerca biologica, biochimica, genetica. Disponibile un numero sterminato di ceppi mutanti.
- Il tempo di riproduzione in fase logaritmica è di circa 22 minuti a 37°C in terreni ricchi di nutrienti: aminoacidi, vitamine, sali e una fonte di carbonio (particolari ceppi mutanti possono richiedere più tempo).
- Cresce pure, più lentamente, in terreni “minimi”, cioè terreni poveri di nutrienti (sali e una fonte di carbonio). Questa proprietà si sfrutta con i mutanti nutrizionali.
- Ha un unico cromosoma circolare, di circa  $4,6 \times 10^6$ bp.
- Ospita plasmidi naturali, coniugativi e non coniugativi.
- E' infettato da batteriofagi, virulenti e temperati.
- Organismo procariote dalla forma di bastoncello, mobile, corto: misura meno di 1 micrometro di lunghezza.
- Gram-negativo, si rinviene in natura nell'intestino dell'uomo ma non, di norma, nel terreno o nell'acqua.
- Non è patogeno, tuttavia lo può diventare se acquisisce plasmidi virulenti.
- Si divide per scissione binaria.
- Versatile: cresce sia in condizione aerobica che anaerobica (presenza o assenza di ossigeno).

# COLTIVAZIONE DI E.COLI

## Terreni ricchi di nutrienti

Per la crescita di colture di E. coli si usa in genere il classico terreno ricco di nutrienti sviluppato da Luria e Bertani negli anni '50 (terreno LB):

- 1% bacto-tryptone
- 0,5% estratti di lievito
- 0,9% NaCl

I terreni solidi (crescita in piastre) si ottengono aggiungendo agar alla concentrazione finale di 1,5%.

E' molto importante mantenere condizioni di sterilità! I terreni si sterilizzano in autoclave a 121°C per 20 minuti, per distruggere qualsiasi microrganismo vivente, spore comprese.

## Crescita dei batteri

A 37°C con vigorosa agitazione, per favorire una buona aerazione del terreno.

## Stoccaggio

Le colture batteriche si mantengono vitali in frigorifero a 4°C per qualche settimana.

Per conservare i batteri a lungo è necessario congelarli. Si parte da una coltura fresca satura di batteri e si aggiunge glicerolo alla concentrazione finale di 15-20%. Le colture in glicerolosi mantengono vitali:

- 20°C per circa 1 anno
- 80°C praticamente per sempre

# APPROFONDIMENTO: GLI OPERONI

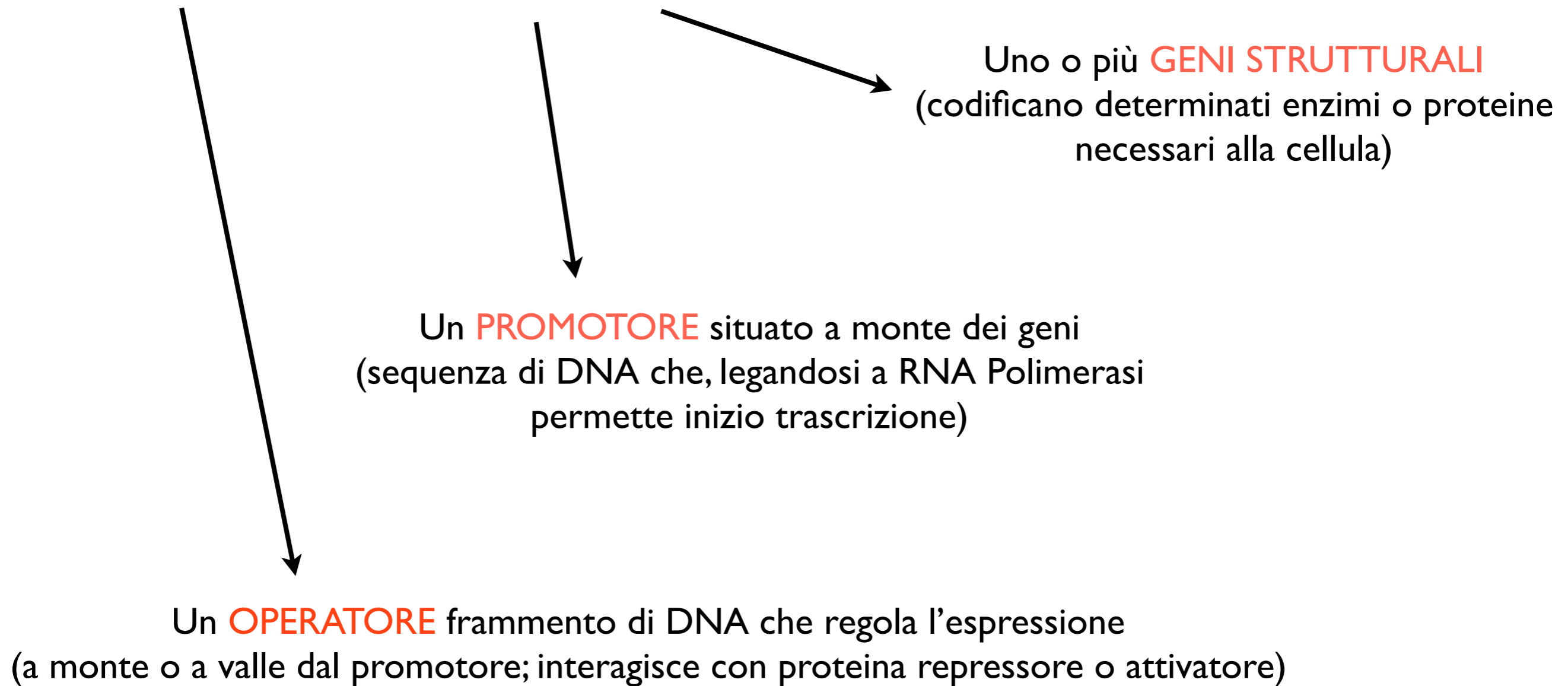
Insieme di geni regolati in modo strettamente coordinato

## Regolazione genica nei Procarioti

contengono particolari sequenze (siti di controllo) che regolano  
l'espressione genica dell'intero operone

Studiati per la prima volta nel 1961 dai Biologi francesi  
Francois Jacob e Jacques Monod

# STRUTTURA DEGLI OPERONI





# REGOLAZIONE GENICA DEGLI OPERONI



NEGATIVA

POSITIVA

Operoni Repressibili

Operoni Inducibili

Trascrizione normale  
(proteina incapace di legarsi all'operatore)

Normalmente proteina legata all'operatore (no trascrizione)  
Molecola induttrice: si lega alla proteina repressore

Corepressori: si legano alla proteina  
cambio di conformazione

Cambio di conformazione: la proteina non lega l'operatore



legame con proteina:  
NO TRASCRIZIONE

TRASCRIZIONE

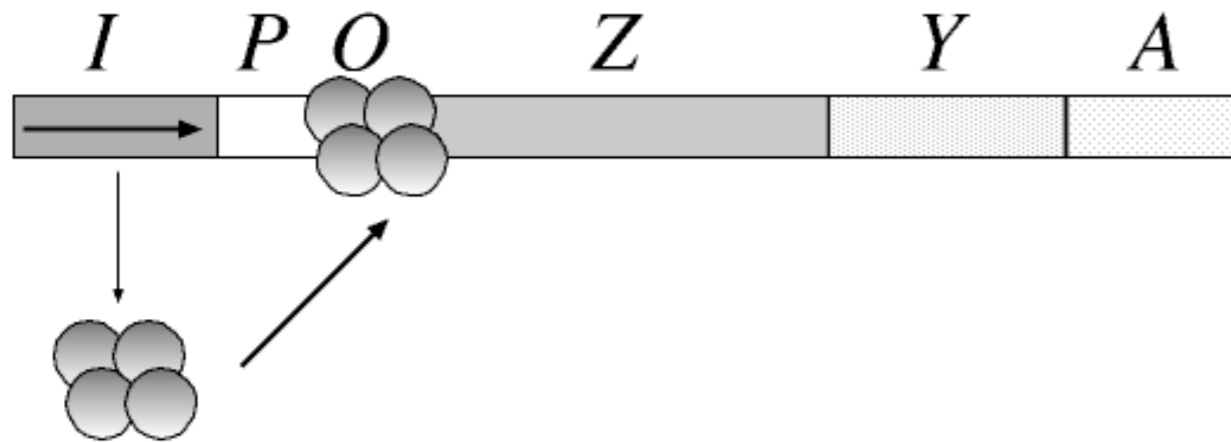
INVERSO

# ESEMPIO: OPERONE lac

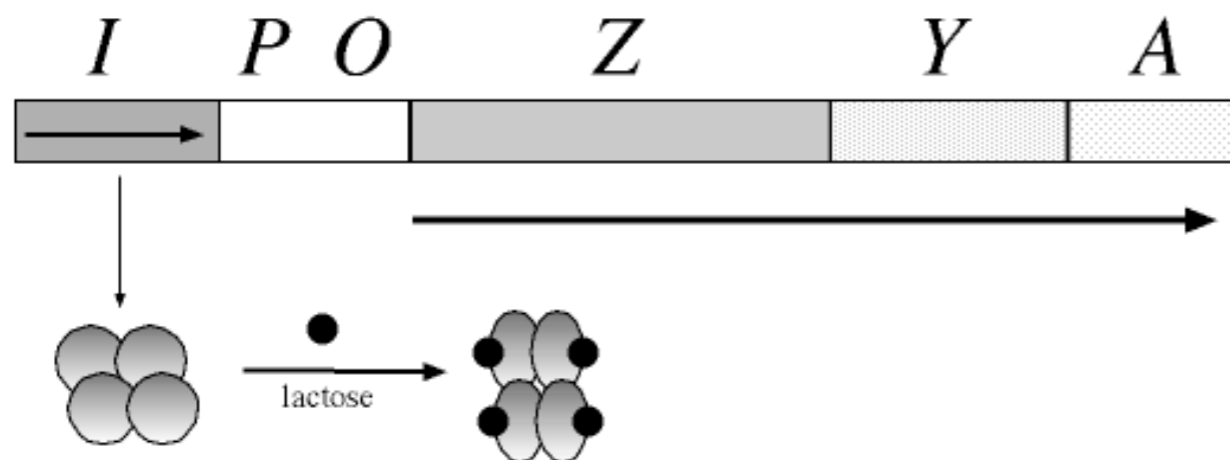
(Operone lattosio; E.coli)



No lactose



Lactose present



## REGIONE lacZ

codifica per l'enzima  $\beta$ -galattosidasi che scinde il lattosio (ma agisce anche con qualsiasi altra molecola che abbia un legame  $\beta$ -galattosidico),

## REGIONE LacY

codifica per la lattosio permeasi, un enzima che permette al lattosio di attraversare la membrana cellulare del batterio

## REGIONE LacA

che codifica per l'enzima transacetilasi, enzima che aggiunge gruppi acetili al lattosio non appena entrato nella cellula.

## REGIONE LacO

definito gene operatore e ha la capacità di legare una particolare proteina, detta proteina repressore, che impedisce la trascrizione dell'operone

## REGIONE LacI

gene regolatore: esso sintetizza la proteina repressore, che legandosi al gene operatore, impedisce la trascrizione dell'operone

## REGIONE P (p1 e p2)

p1: sito CAP, luogo in cui si lega la proteina CAP, detta anche CRP  
p2 è il promotore dell'operone: il sito a cui si lega la RNA polimerasi

# REGOLAZIONE DELL'OPERONE *lac*

*E. coli* è un batterio capace di utilizzare come fonte di carbonio sia il glucosio che il lattosio. Tuttavia, lo zucchero più adatto al suo metabolismo è il glucosio, tanto che se il batterio cresce in un substrato che presenta entrambi gli zuccheri, utilizza unicamente il glucosio. Tuttavia, se il batterio si trova a crescere in un ambiente in cui è presente unicamente il lattosio, immediatamente sintetizza gli enzimi necessari a metabolizzarlo. Il batterio possiede perciò un meccanismo di controllo che consente l'espressione di alcuni geni solo quando ne avverte il bisogno, e impedisce la produzione di enzimi e proteine non strettamente necessarie.

Le sequenze p1, p2, O e I dell'operone di *E. coli* hanno un ruolo fondamentale in questo processo. La sequenza p2 serve per l'attacco della Rna polimerasi, l'enzima che effettua la trascrizione. Questa, dopo essersi legata, scorre a valle e, giunta all'inizio del gene Z, comincia a trascrivere i tre geni strutturali in un mRNA. In assenza di lattosio, tuttavia, la trascrizione non avviene: il gene I (che non è adiacente) produce a ritmo costante una proteina, il repressore, che quando si lega al gene operatore o impedisce alla polimerasi di trascrivere l'operone.

Quando però nell'ambiente è presente il lattosio, questo si lega alla proteina repressore impedendone il legame con l'operatore: è così possibile la trascrizione dell'operone.

Anche in presenza di lattosio, la trascrizione dell'operone è scarsa finché è presente in quantità il glucosio, lo zucchero più facilmente utilizzabile da parte di *E. coli*. Quando il glucosio scarseggia viene prodotto AMP ciclico (cAMP), una molecola che in tutti gli organismi funziona come segnale di carenza energetica. Il cAMP legandosi alla CRP (proteina recettrice del cAmp) -chiamata in inglese proteina CAP (Catabolite Activator Protein)- la rende in grado di legarsi, tra l'altro, alla sequenza p1 stimolando notevolmente la trascrizione dell'operone. Riassumiamo le situazioni possibili:

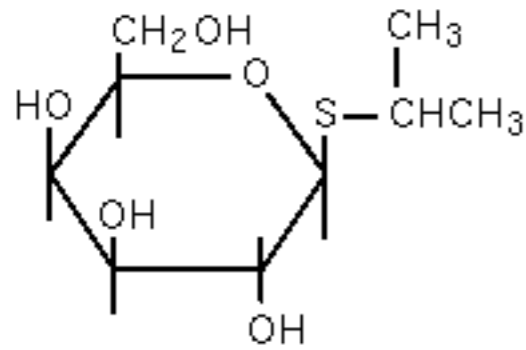
- In presenza di glucosio e lattosio, il repressore è inattivo ma lo è anche la CRP, per cui vi è una trascrizione moderata.
- In presenza di glucosio ma non di lattosio, il repressore è attivo e la CRP inattiva, per cui non vi è trascrizione.
- In assenza di glucosio e di lattosio, il repressore e la CRP sono entrambi attivi e non vi è trascrizione.
- In presenza di lattosio e assenza di glucosio, il repressore è inattivo e la CRP è attiva, per cui l'operone viene espresso al massimo.

Altri operoni sono regolati in modo più o meno diverso. Ad esempio, l'operone istidina, che contiene i geni degli enzimi per la biosintesi dell'amminoacido in questione, ha un repressore che viene attivato dal legame con l'istidina: in questo modo non viene sintetizzata una sostanza quando è già presente in quantità adeguata (anche in questo caso vi è retroazione negativa). Infine la regolazione in base alla presenza di lattosio è negativa-induttiva mentre in base alla presenza del glucosio è positiva. Si ha una doppia regolazione

# DUE MOLECOLE.....INTERESSANTI

## IPTG

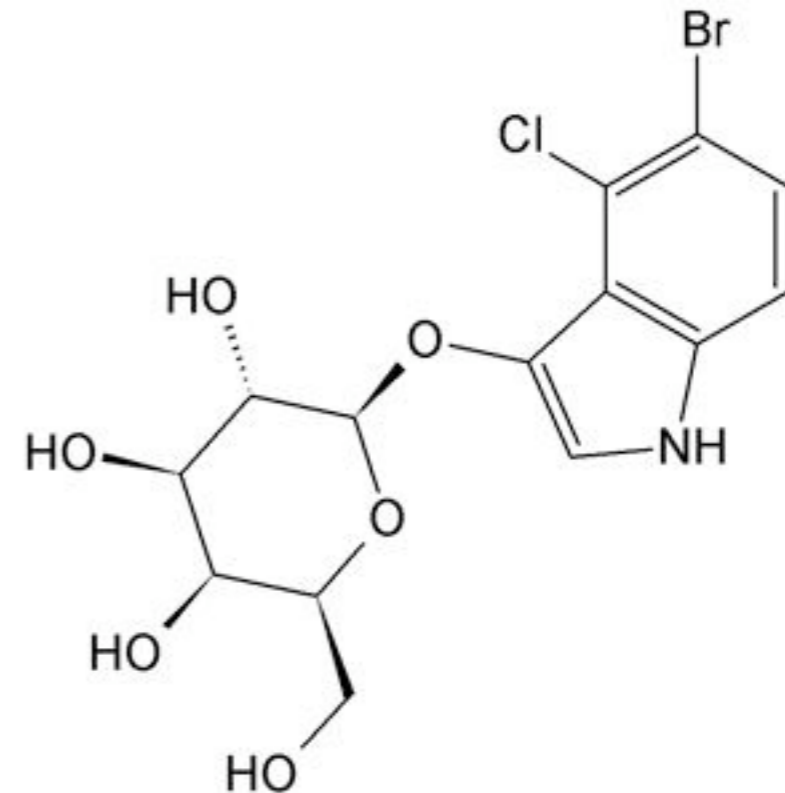
Isopropil-b-D-tiogalattoside



Promotore dell'operone lac

## X-GAL

5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galattoside



Substrato cromogeno per b-galattosidasi

# ESEMPIO DI UTILIZZO

**Biolife** Italiana S.r.l.

**Scheda Tecnica**

N°401641 B I-1 gen. '03 Pagina 1 di 2

## LSB X-GAL MUG

Terreno cromogenico e fluorogenico per la determinazione simultanea dei coliformi e di *Escherichia coli* con metodo MPN

### FORMULA TIPICA (g/l)

X-GAL	0,08
IPTG	0,10
MUG	0,05
Sodio cloruro	5,00
Potassio fosfato bibasico	2,75
Potassio fosfato monobasico	2,00
Triptosio	5,00
L-Triptofano	2,00
Sorbitolo	1,00
Sodio laurilsolfato	0,10

### PREPARAZIONE

Sospendere 18,1 g di terreno in 1000 ml di acqua distillata fredda. Riscaldare fino a completa solubilizzazione. Distribuire in ragione di 9 ml per provetta. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

Per l'esame delle acque con metodo MPN, usare il terreno concentrato secondo le necessità.

pH finale  $6.8 \pm 0.1$

## DESCRIZIONE

LSB X-GAL MUG è una modificazione del terreno Lauryl Sulphate Broth, idonea alla determinazione contemporanea dei coliformi e di *E. coli* negli alimenti e nelle acque, con metodo MPN. Il terreno è reso selettivo dalla presenza del sodio lauril solfato; la differenziazione dei coliformi e di *E. coli* è resa possibile dalla presenza del substrato cromogeno X-GAL (5 bromo-4 cloro-3 indolil beta D-galattopiranoside), per l'evidenziazione della beta galattosidasi e del substrato fluorogenico MUG (4-metilumbelliferil beta D-glucuronide) per l'evidenziazione della beta glucuronidasi.

L'X-GAL è idrolizzato dai coliformi con rilascio di un metabolita blu/verde-blu; tale reazione è potenziata dalla presenza nel terreno di IPTG (isopropil-beta D-tiogalattopiranoside), amplificatore della beta galattosidasi. Il MUG è idrolizzato, tra gli enterobatteri, da *Escherichia coli* e da pochi altri ceppi di *Salmonella* e *Shigella*. Tale idrolisi si traduce nel rilascio di 4-metilumbelliferone, fluorescente sotto lampada di Wood. Il triptofano contenuto nel LSB X-GAL MUG, consente di eseguire il test dell'indolo direttamente sulle provette con l'aggiunta del reattivo di Kovacs, per la conferma di *E. coli*.

## IMPIEGO

Eseguire la determinazione contemporanea dei coliformi e di *Escherichia coli*, impiegando le normali metodiche MPN di laboratorio. Incubare 24-48 ore a 37°C.

### *Risultati attesi*

Coliformi totali: crescita blu/verde-blu

*Escherichia coli*: crescita blu/verde blu, fluorescente sotto lampada di Wood (emissione a 366 nm), positiva al test dell'indolo. Tale test è eseguibile aggiungendo circa 1 ml di reattivo di Kovacs (cod. 19171000) alle provette ed osservando per la formazione di un anello rosso entro 1-2 minuti.

[...] Una volta inscritto nella struttura del DNA, l'avvenimento singolare, e in quanto tale essenzialmente imprevedibile, verrà automaticamente e fedelmente replicato e tradotto, cioè contemporaneamente moltiplicato e trasposto in milioni o miliardi di esemplari. Uscito dall'ambito del puro caso, esso entra in quello della necessità, delle più inesorabili determinazioni. La selezione opera infatti su scala macroscopica, cioè a livello dell'organismo.

Ancora oggi molte persone d'ingegno non riescono ad accettare e neppure a comprendere come la selezione, da sola, abbia potuto trarre da una fonte di rumore tutte le musiche della biosfera. In effetti, la selezione agisce sui prodotti del caso e non può alimentarsi altrimenti; essa opera però in un campo di necessità rigorose da cui il caso è bandito.

Da queste necessità, e non dal caso, l'evoluzione ha tratto i suoi orientamenti generalmente ascendenti, le sue successive conquiste, il dipanarsi ordinato di cui offre apparentemente l'immagine. D'altra parte alcuni evoluzionisti post-darwiniani hanno avuto la tendenza di diffondere un'idea impoverita, ingenuamente feroce, della selezione naturale, cioè quella della pura e semplice "lotta per la vita" espressione che d'altronde non fu introdotta da Darwin bensì da Spencer[1]. I neodarwinisti del primo Novecento ne hanno proposto invece una visione molto più feconda, dimostrando, sulla base di teorie quantitative, che il fattore decisivo della selezione non è costituito dalla lotta per la vita, ma dal tasso differenziale di riproduzione in seno a una specie[2]. I dati forniti dalla Biologia contemporanea consentono di chiarire e di precisare ulteriormente il concetto di selezione. In particolare, noi abbiamo, della potenza, della complessità e della coerenza della cibernetica intracellulare (perfino negli organismi più semplici) un'idea abbastanza chiara, un tempo sconosciuta, che ci consente di comprendere molto meglio di prima che ogni "novità" sotto forma di alterazione di una struttura proteica, verrà innanzitutto saggiata riguardo la sua compatibilità con l'insieme di un sistema già assoggettato a innumerevoli vincoli che controllano l'esecuzione del progetto dell'organismo.



Le sole mutazioni accettabili sono dunque quelle che perlomeno non riducono la coerenza dell'apparato teleonomico ma piuttosto lo rafforzano ulteriormente nell'orientamento già adottato oppure, certo molto più raramente, lo arricchiscono di nuove possibilità. È l'apparato teleonomico, proprio come funziona nell'attimo in cui per la prima volta si esprime una mutazione, che definisce le condizioni iniziali essenziali per l'accettazione, temporanea o definitiva, oppure per il rifiuto del tentativo nato dal caso. E proprio la prestazione teleonomica, espressione globale delle proprietà della rete d'interazioni costruttive e regolatrici, a essere giudicata dalla selezione. ... Ed è per questo motivo che l'evoluzione stessa sembra realizzare un 'progetto', quello di prolungare e dare un maggior respiro a un 'sogno' ancestrale. Grazie alla perfezione conservatrice dell'apparato replicativo, ogni mutazione, individualmente, costituisce un avvenimento molto raro.

**Jacques Monod**  
**“Il caso e la necessità”**