



PROGETTO BIOTECNOLOGIE A SCUOLA – EUREKA 6

A cura di: Prof. Nicola Zambrano, Prof. Vincenzo De Simone, Prof.ssa Monica Piedimonte



Martedì 3 giugno 2014 ore 10.30-12.30
Teatro del Convitto Nazionale Vittorio Emanuele

Gli alunni:

Adele Cipolletta IID

Valentina Fusco IIC

Giuseppe Lipardi IIE

Raffaele Marrone IIE

presenteranno il percorso del progetto, fino ai risultati conclusivi dell'indagine, con particolare attenzione alle metodiche biotecnologiche impiegate.

Le presentazioni degli alunni saranno precedute da una breve introduzione
a cura di:

Prof. Nicola Zambrano

Ordinario di Biologia Molecolare
Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II
Presidente Associazione Culturale DiSciMuS

Prof. Vincenzo De Simone

Ordinario di Biochimica
Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II

Prof.ssa Monica Piedimonte

Referente del progetto

UN «TRIP» NELLE BIOTECNOLOGIE

Mutageni, mutazioni e retromutazioni del gene *trpE* di *E. coli*

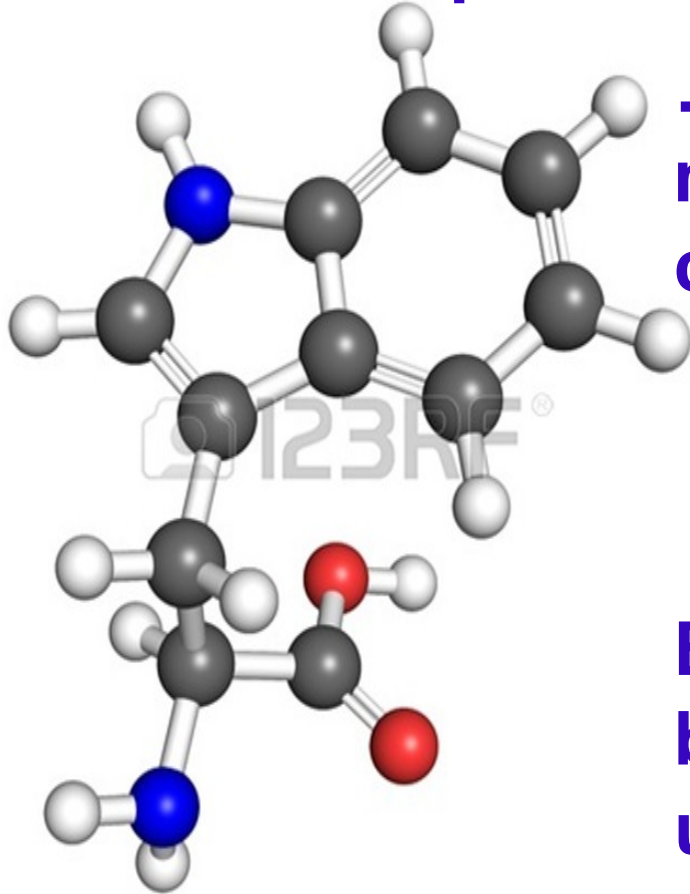


**TRIP come viaggio nel mondo delle
Biotecnologie
compiuto insieme, docenti e studenti.....**

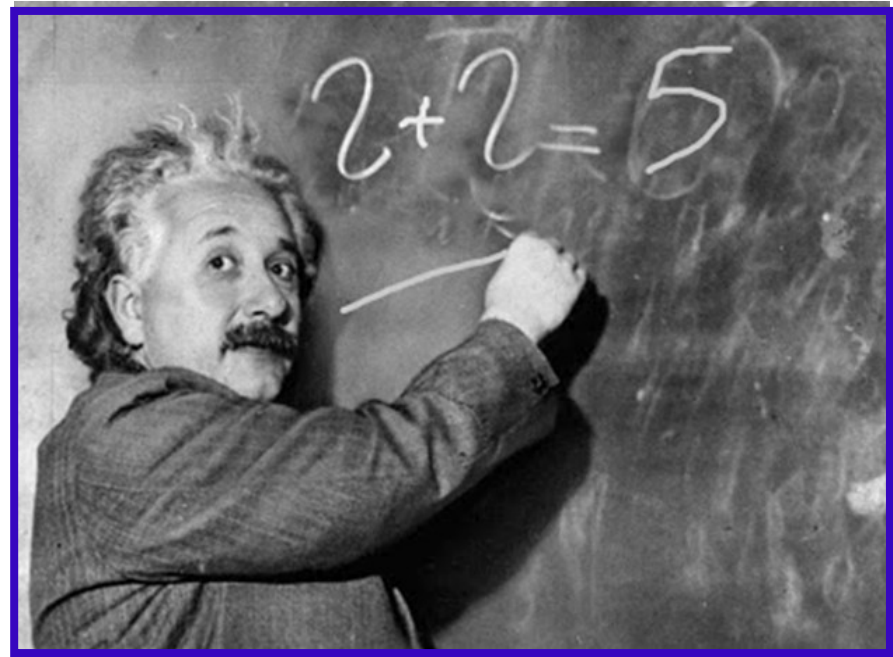
**.....ma anche «TRIP», o
meglio,«TRP»
come l' amminoacido**

TRIPTOFANO

**Ed uno dei geni per la sua
biosintesi (*trpE*) che abbiamo
utilizzato come «modello» nel
corso del nostro progetto
sperimentale**



I INCONTRO : il prof. Vincenzo De Simone



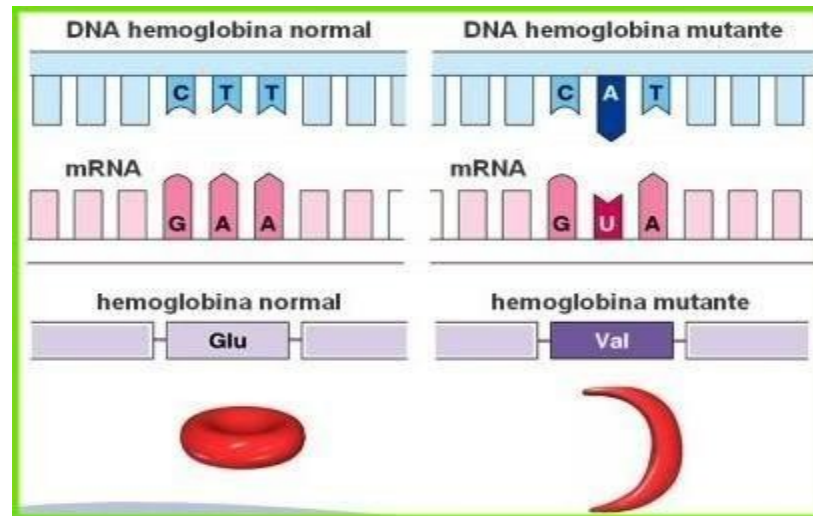
**ci ha illustrato
le finalità del
progetto**



SCOPO DEL PROGETTO

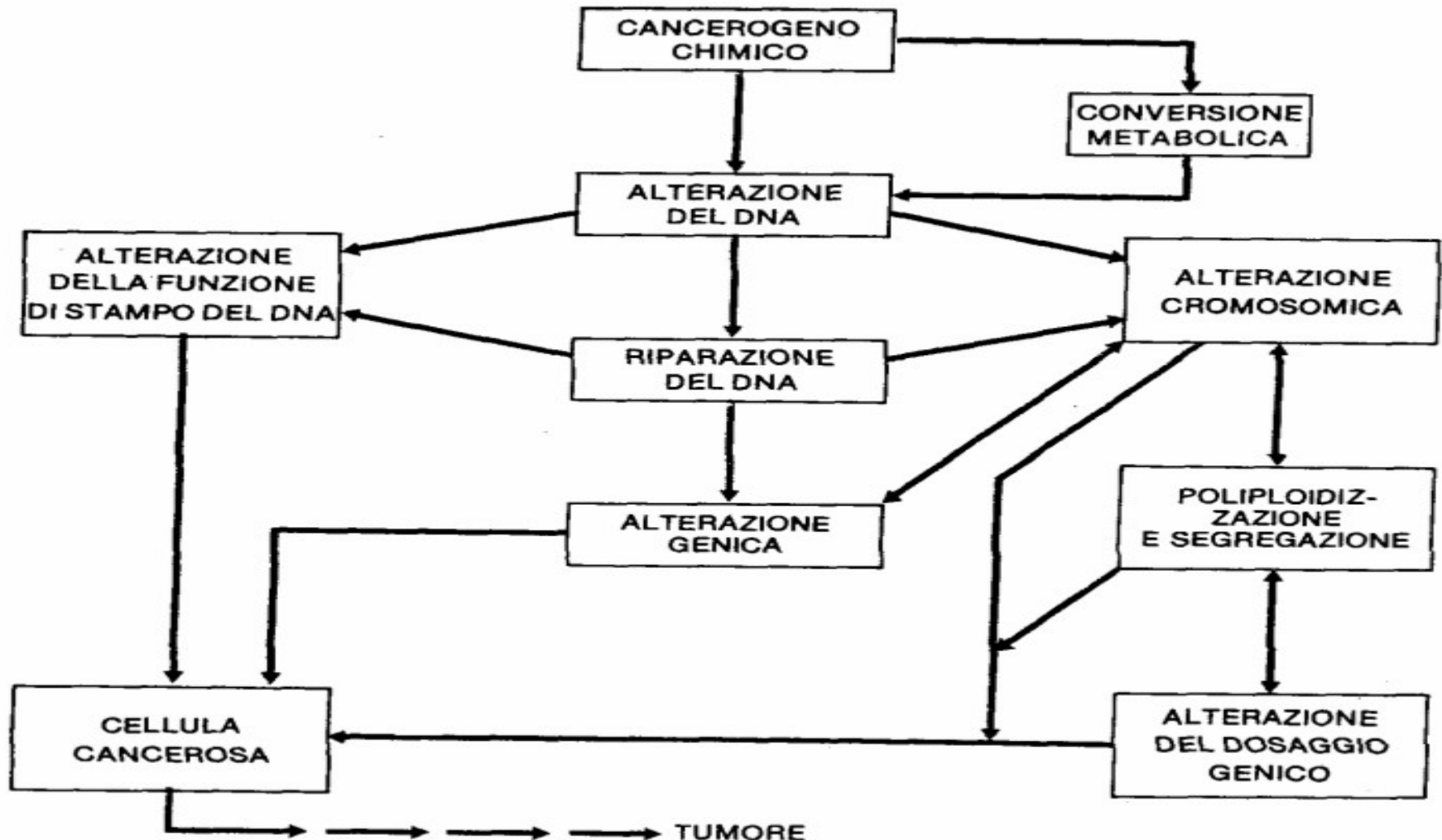
Dimostrare la capacità di alcune sostanze tossiche di produrre mutazioni del DNA

Le mutazioni rendono difettosi i geni e quindi alterano l'espressione genica

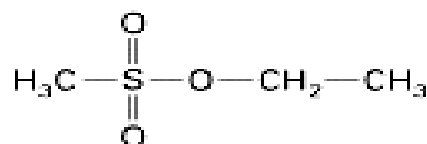
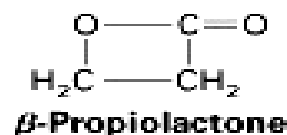


Le mutazioni puntiformi implicano un cambiamento in un singolo nucleotide di DNA e, di conseguenza, un cambiamento in una specifica tripletta che codifica per un aminoacido (codone)

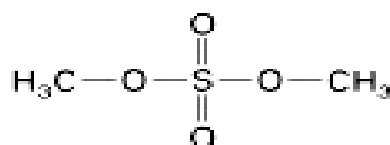
Molte mutazioni sono alla base della cancerogenesi...



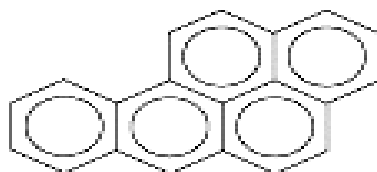
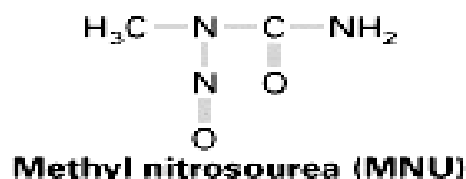
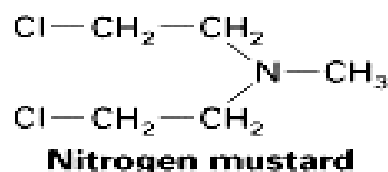
...e numerosi sono gli agenti chimici mutageni e carcinogeni



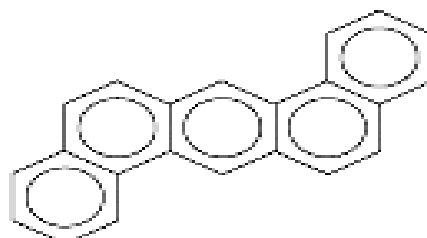
Ethylmethane sulfonate (EMS)



Dimethyl sulfate (DMS)



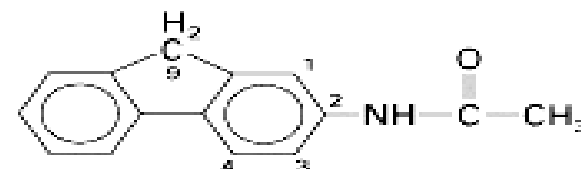
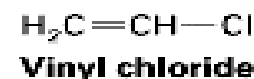
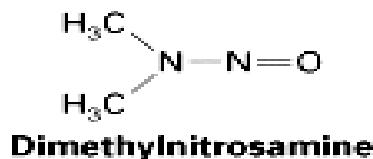
**Benzo(a)pyrene
(3,4-benzpyrene)**



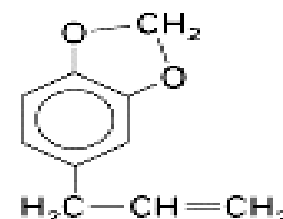
Dibenz(a,h)anthracene



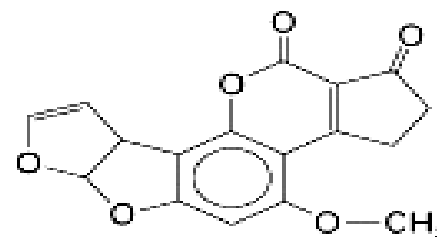
2-Naphthylamine



2-Acetylaminofluorene



**Safrole
(sassafras)**



**Aflatoxin B₁
(*Aspergillus flavus*)**

Noi abbiamo osservato sperimentalmente gli effetti mutageni della Sodio Azide



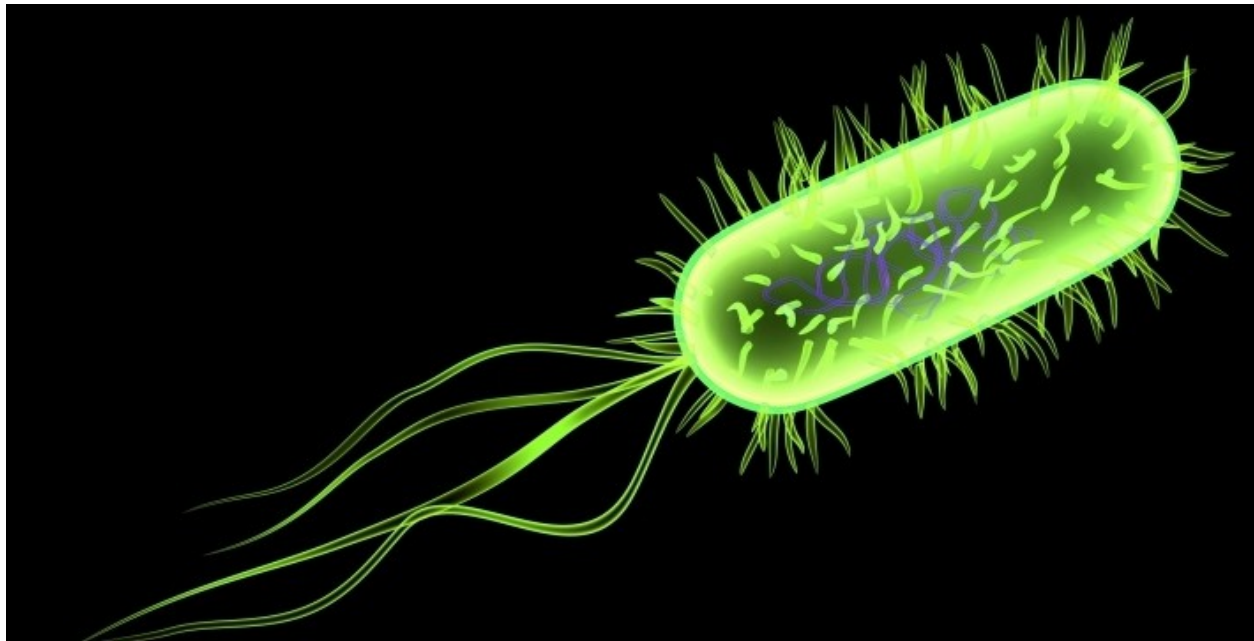
La sodio azide viene impiegata per diversi utilizzi:

- ❖ Negli airbag delle automobili: una carica elettrica innescata dall'impatto dell'automobile provoca l'esplosione della sodio azide e il rilascio di gas di azoto all'interno dell'airbag.
- ❖ Nei detonatori o negli esplosivi
- ❖ Come conservante chimico: soprattutto negli ospedali e nei laboratori.
- ❖ In agricoltura: per il controllo degli insetti nocivi.

Abbiamo lavorato su un ceppo di batteri *Escherichia coli* mutanti per il gene *trp-E* (ceppo *trpE65*), incapaci perciò di sintetizzare l'amminoacido TRIPTOFANO.

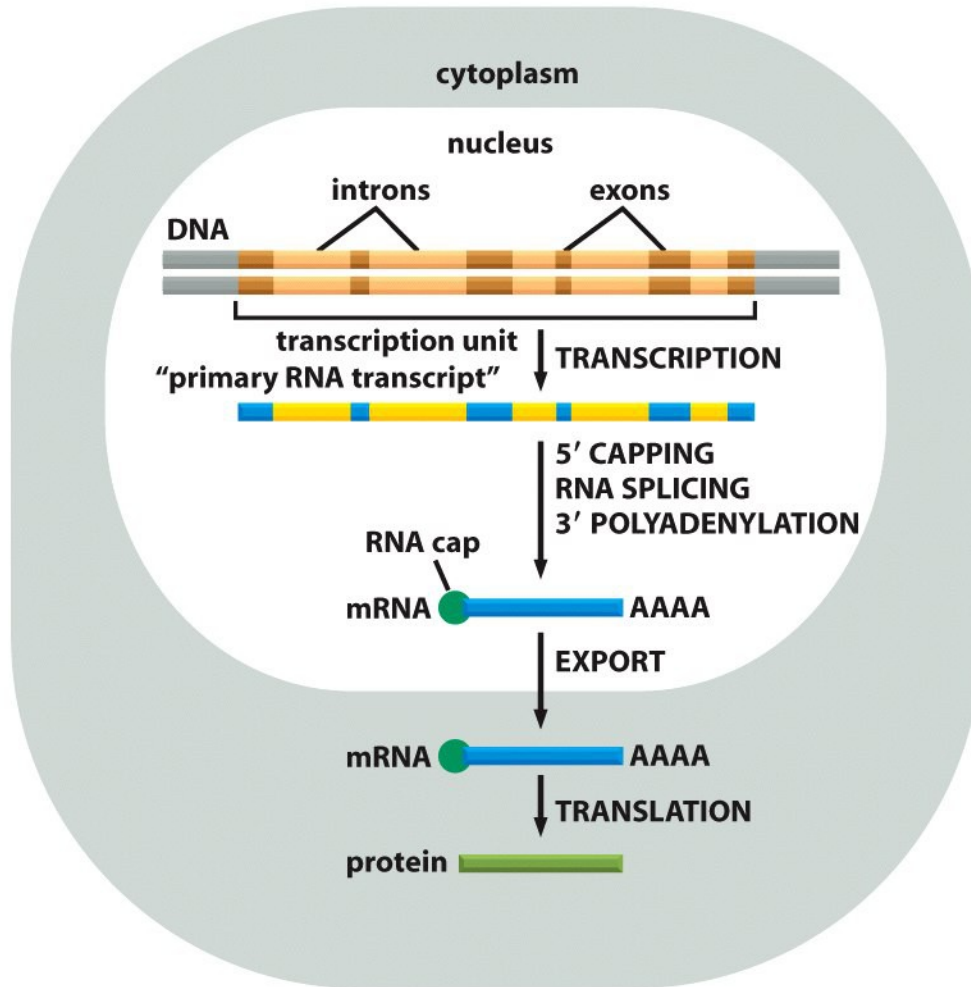
Li abbiamo sottoposti al test di AMES per dimostrare la mutagenicità della sodio azide

Al termine del test abbiamo rianalizzato i batteri ed abbiamo riscontrato l'avvenuta retromutazione, prodotta dalla sodio azide, che ha consentito loro la regolare sintesi del Triptofano



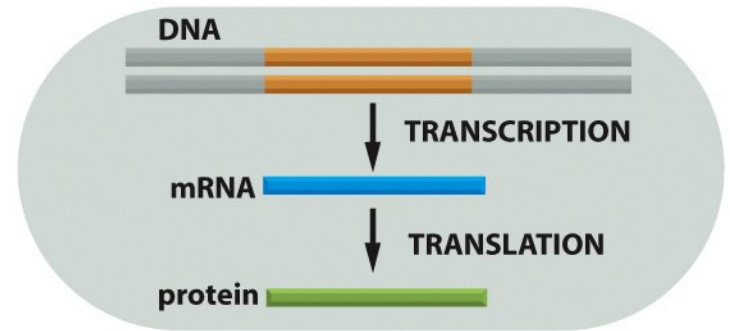
(A)

EUCARYOTES



(B)

PROCARYOTES

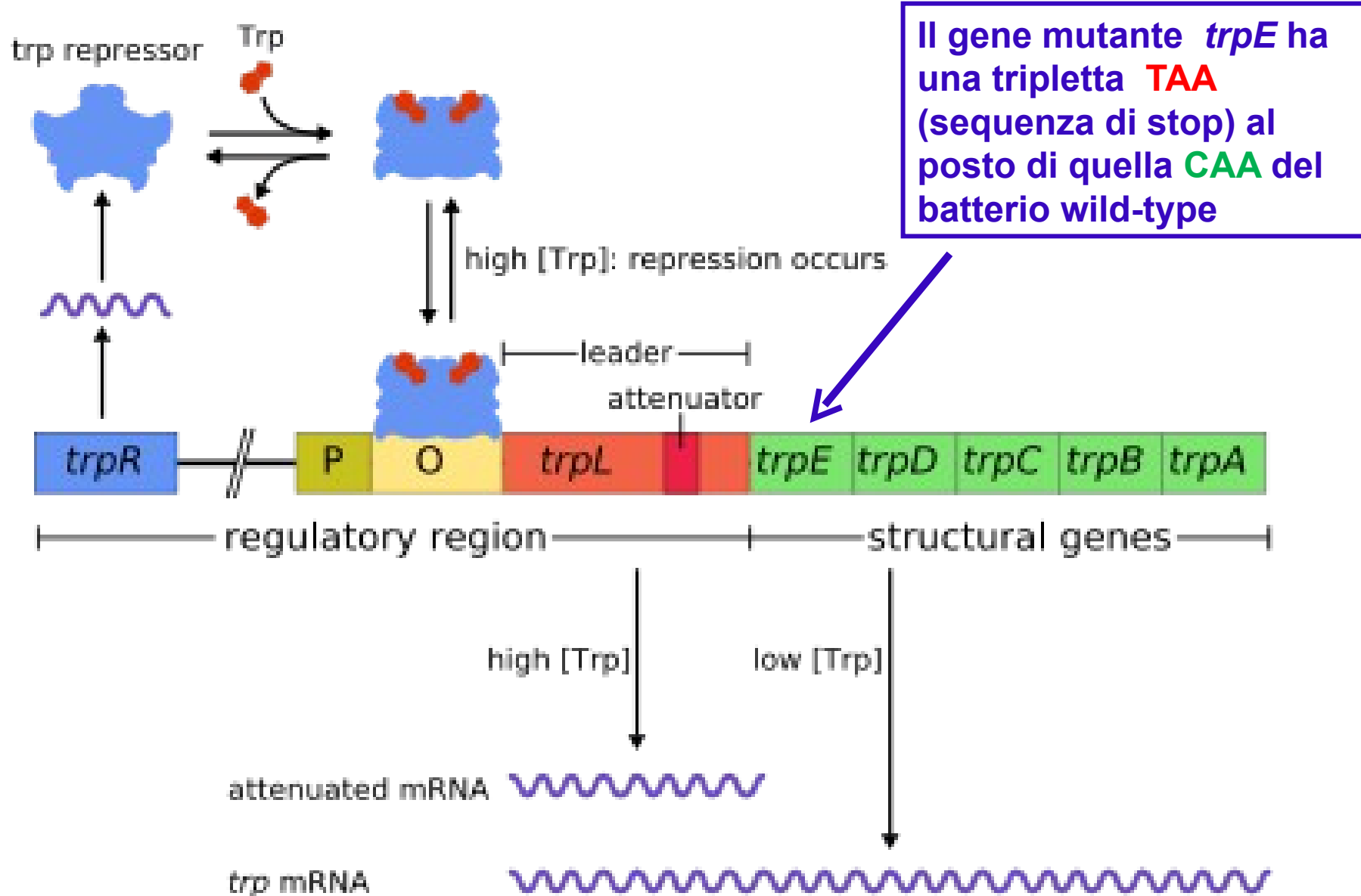


La sintesi proteica dei batteri, molto più semplice di quella delle cellule più evolute, prevede la produzione di RNA messaggero per trascrizione e la traduzione di questo in proteine.

La trascrizione interessa 5 geni contemporaneamente, organizzati in un complesso di geni chiamato

OPERONE

L'OPERONE *Trp*



IL CODICE GENETICO

AGA										UUA										AGC		
AGG										UUG										AGU		
GCA	CGA						GGA			CUA					CCA	UCA	ACA			GUA		
GCC	CGC						GGC	AUA	CUC						CCC	UCC	ACC			GUC		UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG		UAG	
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU		UGA	
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val		stop	
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V			

Il ceppo di *E. coli* mutante *trpE65* non può produrre Triptofano perché la sostituzione della base azotata **Citosina (C)** con la **Timina (T)** ha trasformato la tripletta originale in una sequenza di stop e la biosintesi viene interrotta dopo il terzo amminoacido...

LA SUA CRESCITA DIPENDERÀ DALL'AGGIUNTA DI TRIPTOFANO NEL TERRENO DI CULTURA

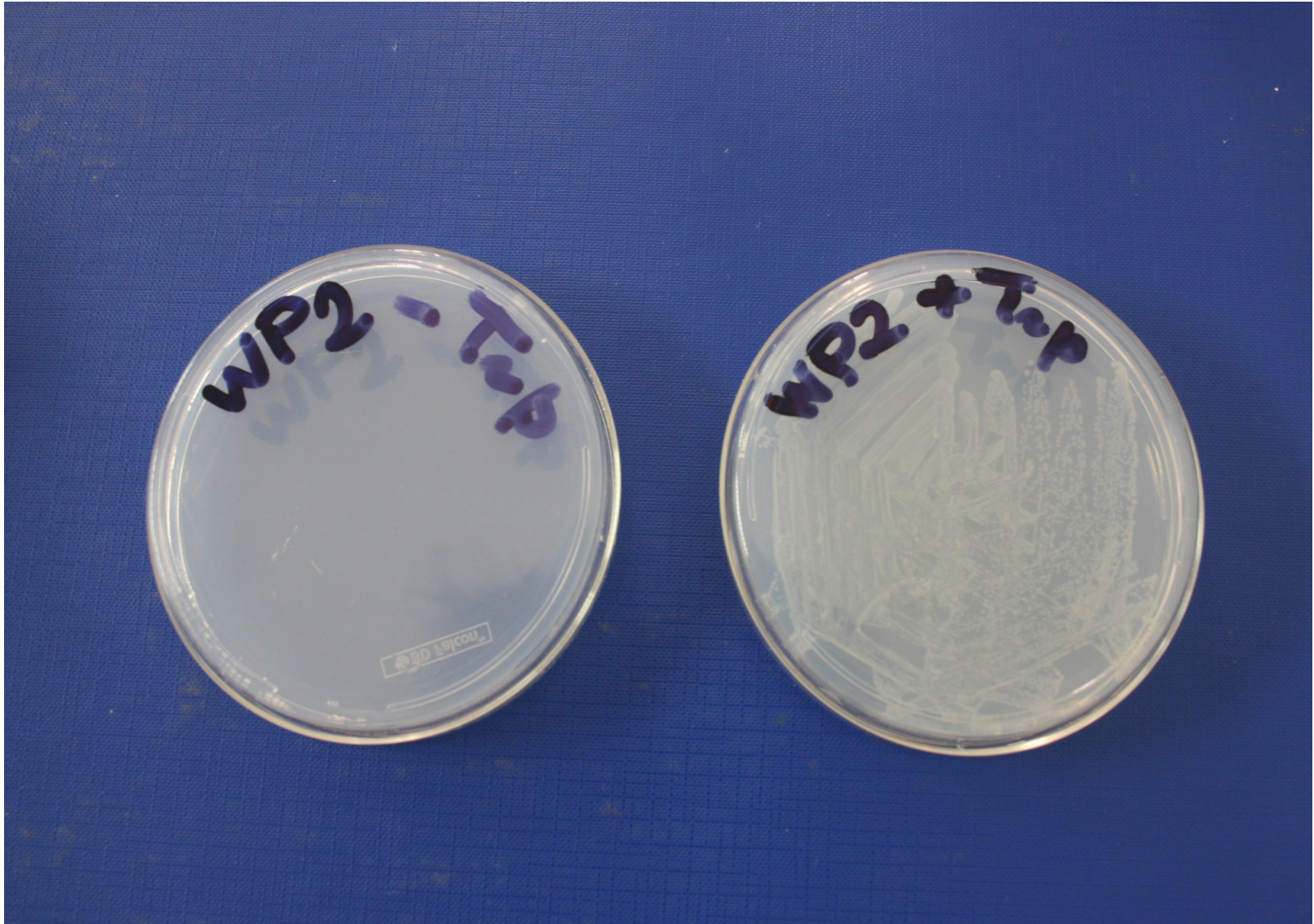
Gene	ATG	CAA	ACA	TAA	AAA	CCG	ACT	CTC	GAA	CAG	CTA	ACC	...
Proteina	Met	Gln	Thr	Stop!									
Codone	1	2	3										



Il ceppo di *E. coli* wild-type, con la tripletta **CAA**, corrispondente alla Glutammina, riesce a proseguire la sintesi e sarà in grado di sopravvivere anche in assenza di Triptofano

Gene	ATG	CAA	ACA	CAA	AAA	CCG	ACT	CTC	GAA	CAG	CTA	ACC	...
Proteina	Met	Gln	Thr	Gln	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	...
Codone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	...

Il ceppo (WP2), con genotipo (*trpE65*) può riuscire a crescere solo nelle condizioni “giuste”



Procedura del Test di Ames

E' stato utilizzato il ceppo di E.Coli con una singola mutazione nel gene necessario per la biosintesi del **Triptofano**

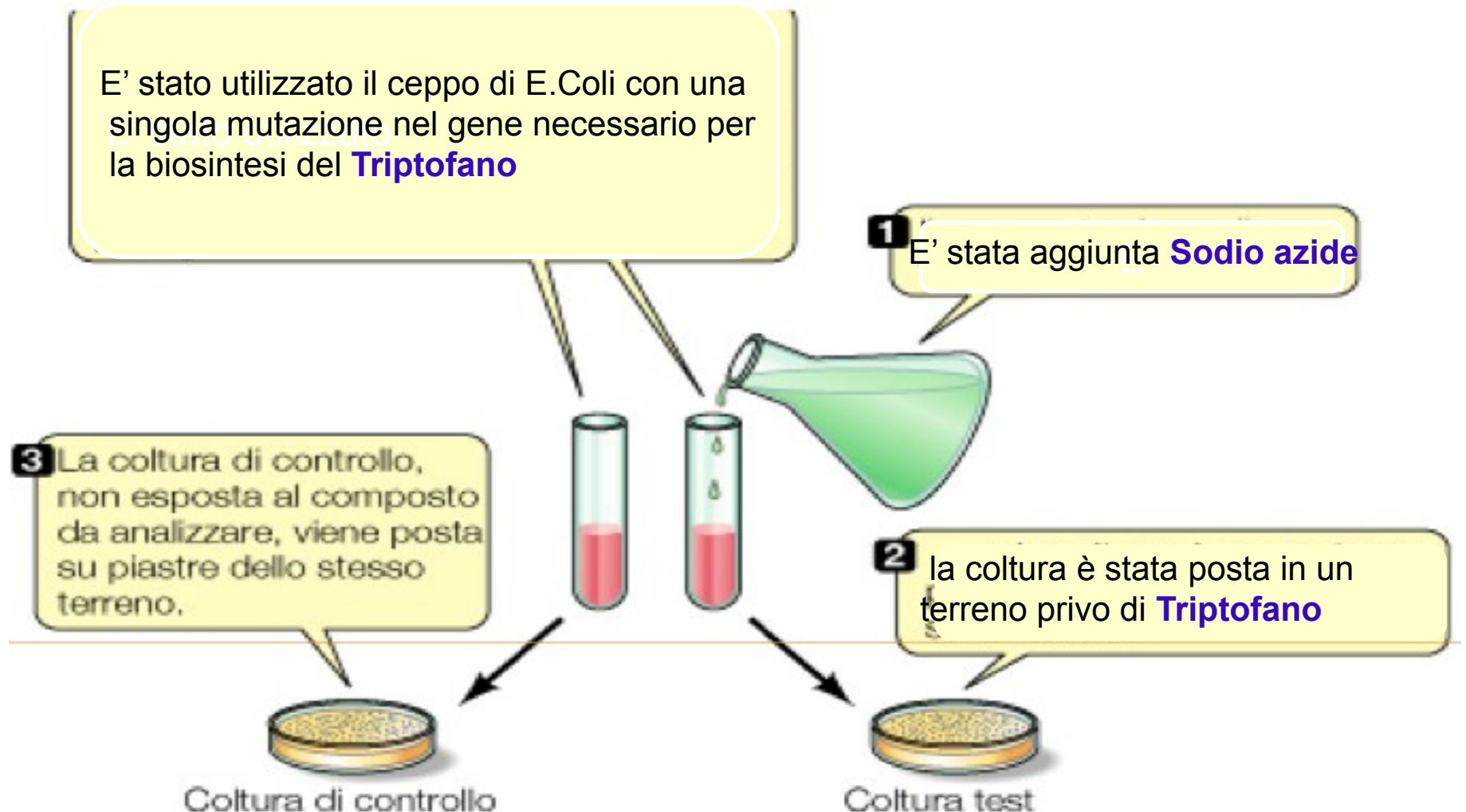
1 E' stata aggiunta **Sodio azide**

3 La coltura di controllo, non esposta al composto da analizzare, viene posta su piastre dello stesso terreno.

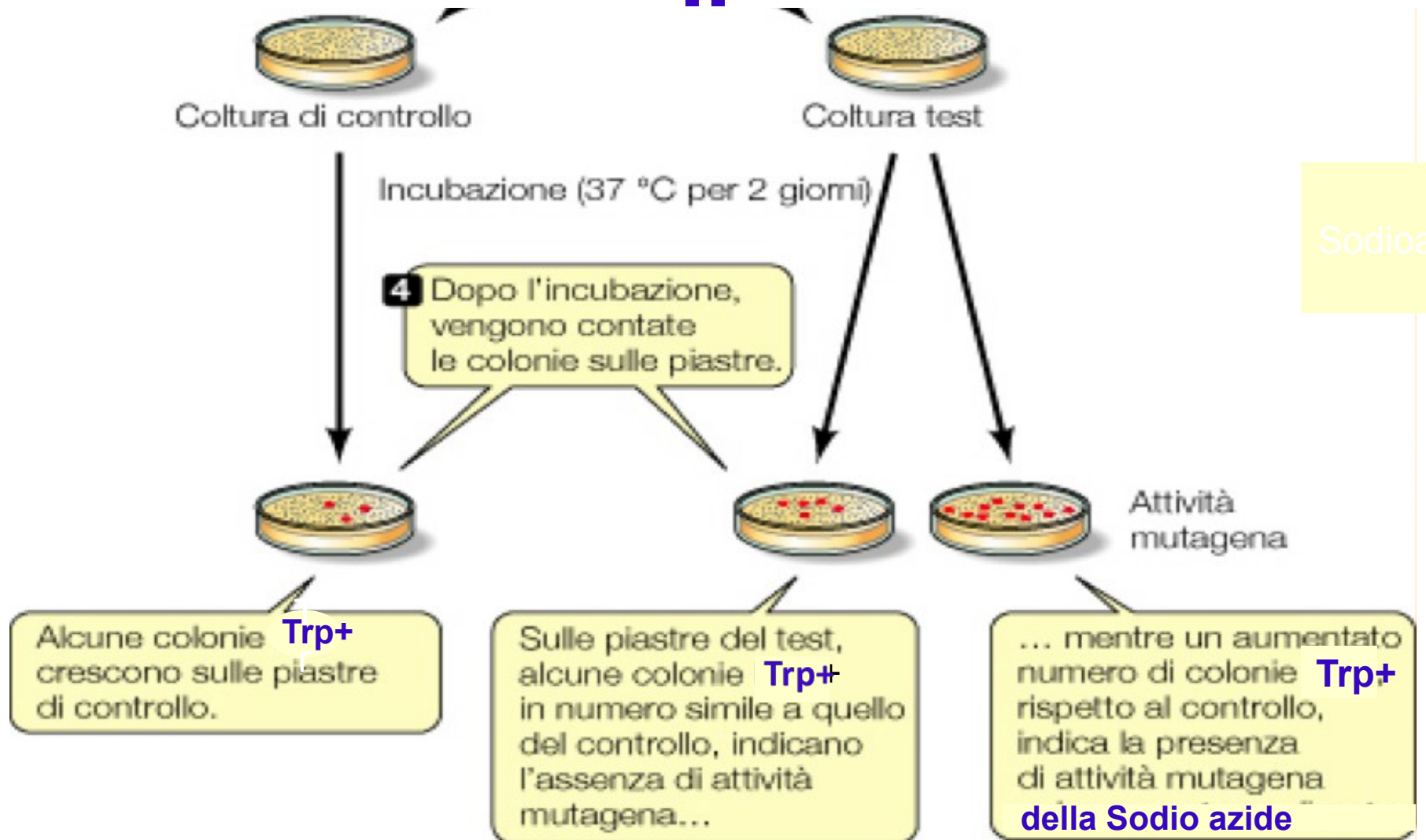
2 la coltura è stata posta in un terreno privo di **Triptofano**

Coltura di controllo

Coltura test



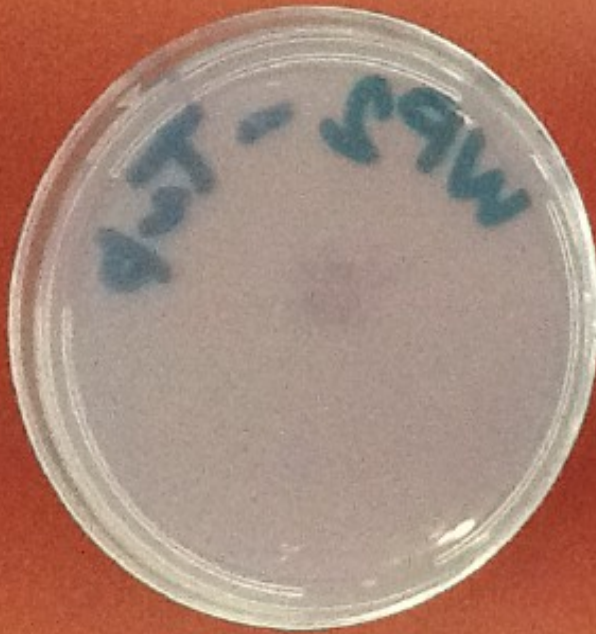
Procedura del Test di Ames - II



II INCONTRO: preparazione di terreni e piastre



- ❖ Sotto la supervisione del prof. Nicola Zambrano, abbiamo preparato terreni di coltura per i batteri contenenti:
LB Medium
Vogel Bonner Medium
Soluzioni :
di Glucosio
di Agar
di Triptofano
- ❖ Abbiamo riempito con tali terreni le capsule Petri su cui abbiamo inoculato le colonie batteriche mutanti.
- ❖ Abbiamo preparato una piastra senza Triptofano di controllo
- ❖ Le abbiamo lasciate in incubazione per 48 h a 37°



**La piastra senza
Tryptofano non
presenta crescita
batterica**

-Trp



**La piastra con
Tryptofano presenta
una copiosa crescita
batterica**

+Trp

III INCONTRO: allestimento del test



Abbiamo prelevato le colonie batteriche mutanti e le abbiamo inoculate su piastre contenenti Sodio azide e povere di Triptofano

Abbiamo preparato piastre di controllo povere di Triptofano e senza Sodio azide

Le abbiamo lasciate in incubazione per 48 h a 37°

IV INCONTRO: analisi dei risultati e prelievo colonie per preparazione di DNA genomico



Abbiamo analizzato le piastre rimaste in incubazione ed abbiamo notato una crescita batterica molto più rigogliosa nelle piastre trattate con Sodio Azide

La sodio azide avrebbe quindi retromutato i nostri batteri, rendendoli capaci di sintetizzare Triptofano...

...ma il Prof. Zambrano non ci ha creduto, e ci ha costretti a lavorare ancora

IV INCONTRO: analisi dei risultati e prelievo colonie per preparazione di DNA genomico



Controllo (no sodio azide)

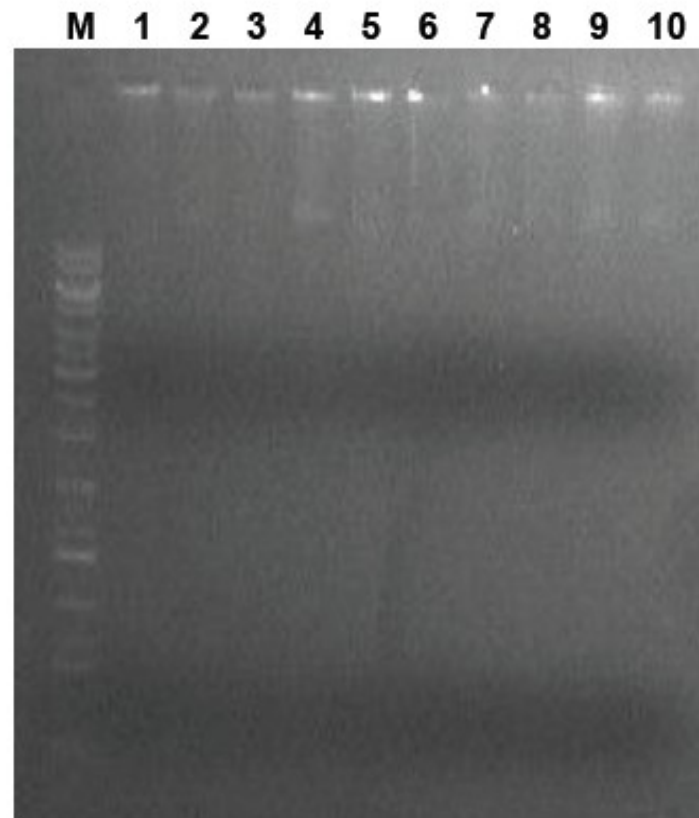
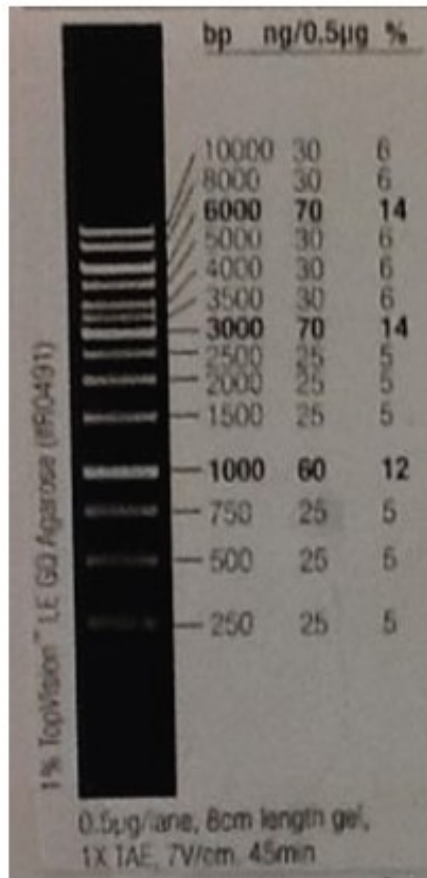
Sodio azide (5 µg)

IV INCONTRO: analisi dei risultati e prelievo colonie per preparazione di DNA genomico



**Abbiamo prelevato
5 colonie dalla
piastra contenente
batteri mutanti e 5
da quella
con la sodio azide
e ne abbiamo
estratto il DNA per
sottoporli ad
amplificazione con
PCR e
sequenziamento**

I nostri campioni di DNA genomico di *E. coli* sono stati sottoposti ad elettroforesi



IV incontro: progettazione dei primers per PCR

Abbiamo progettato i primers per l'amplificazione mediante PCR del segmento di DNA nel quale individuare la mutazione e la retromutazione e sottoporlo a sequenziamento

```
1  ccgggaataagattcaacgccaggtcccgaacgtgaaatttcctctcttgctggcgcgatt
61  gcagctgtggtgtcatgggtcgggtgatcgccaggggtgccgacgcgcactctcgactgcacgg
121 tgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcg
181 taaatcactgcataattcgtgtcgtcgaaggcgcactcccgttctggataatgttttttg
241 cgccgacatcataacggttctggcaaataattctgaaatgagctggtgacaattaatcatc
301 gaactagttaactagtacgcaagttcacgtaaaaagggatatcgacaatgaaagcaatttt
361 cgtactgaaagggttggtggcgcaacttcctgaaacgggacagtgtattcaccatgcgtaaag
421 caatcagatacccagcccgcctaataatgagcgggcttttttttgaacaaaattagagaataa
481 caatgcaaacacaaaaaccgactctcgaactgctaacctgcgaaggcgcttatcgcgaca
541 atcccaccgcgctttttcaccagttgtgtggggatcgctccggcaacgctgctgctggaat
601 ccgcagatatcgacagcaaagatgatttaaaaagcctgctgctggttagacagtgcgctgc
661 gcattacagcttttaggtgacactgtcacaatccaggcactttccggcaacggcgaagccc
721 tcctggcactactggataacgccctgcctgcgggtgtggaaagtgaacaatcaccaaact
781 gccgtgtgctgcgcttccccctgtcagtcactgctggatgaagacgcccgcttatgct
841 ccctttcggtttttgacgctttccggtttattgcagaatctggtgaatgtaccgaaggaag
901 aacgagaagccatgttcttcagcggcctgttctcttatgaccttgtggcgggatttgaag
961 atttaccgcaactgtcagcggaaaataactgcctgatttctgtttttatctcgctgaaa
```

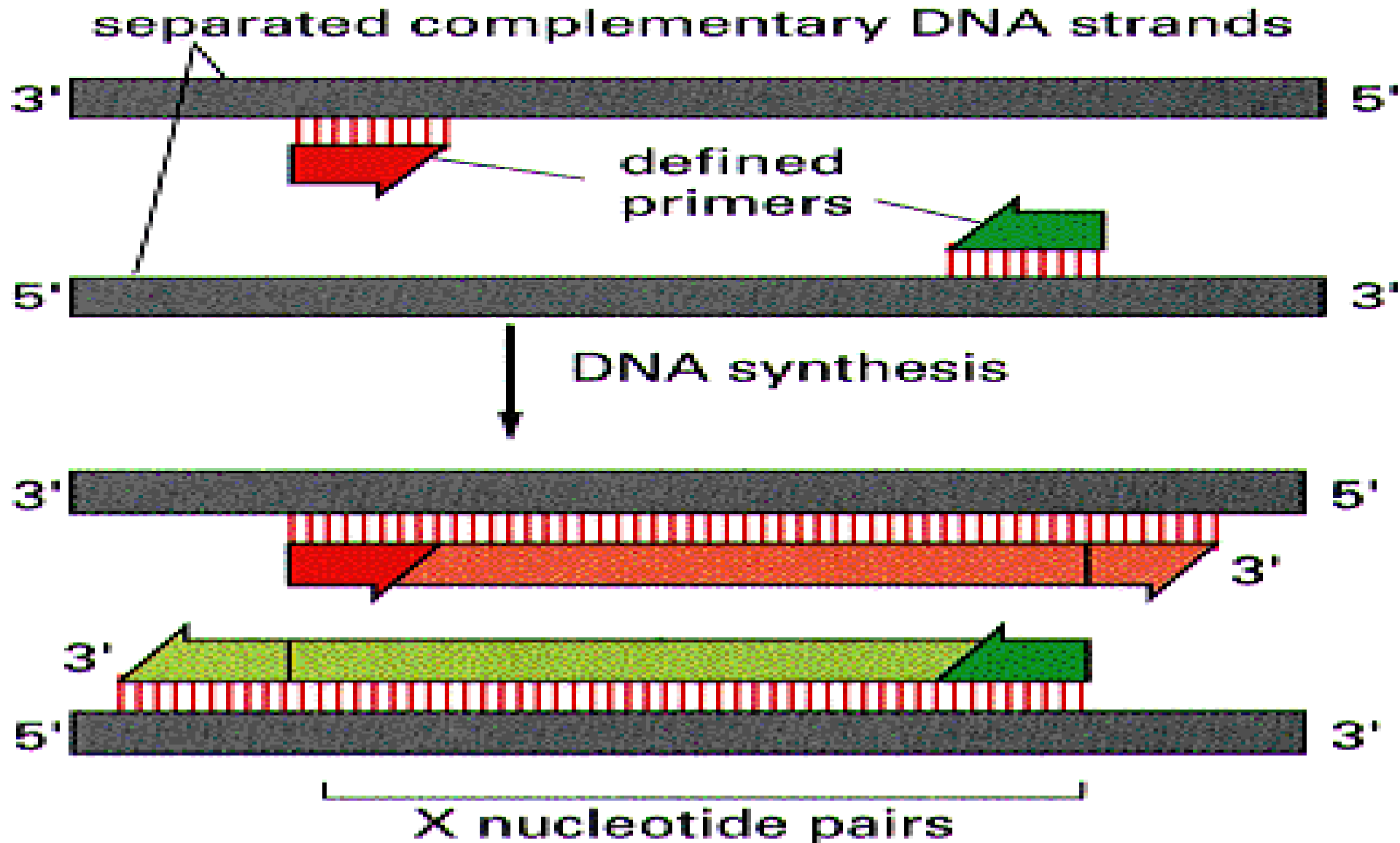
>TrpE_For

5'-TGTATTACCATGCGTAAAG

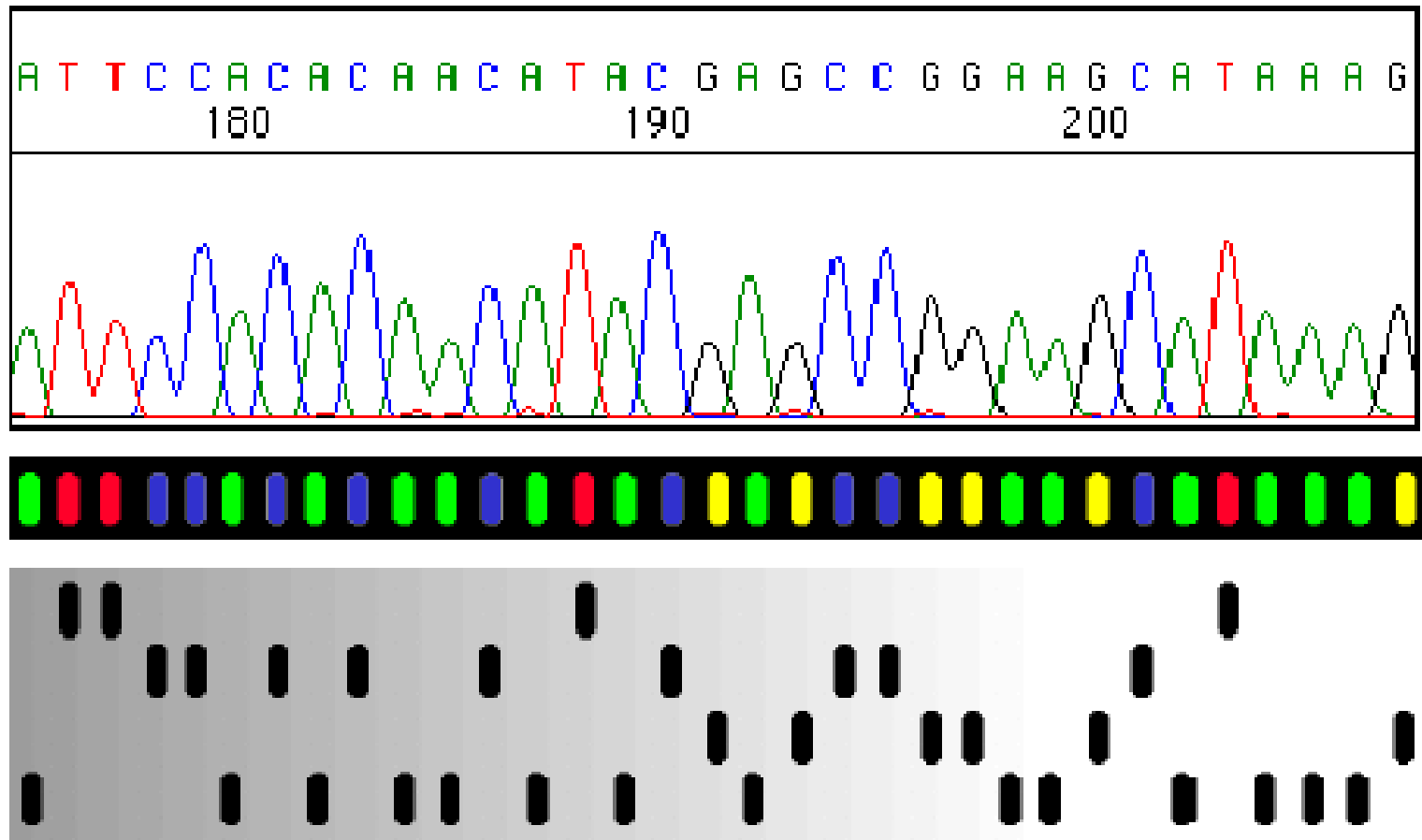
>TrpE_Rev

5'-TGACAGTTGCGGTAAATCTTC

La PCR produce in pochi minuti numerose copie di un segmento ben definito di DNA



Il sequenziamento del DNA consente di conoscere la sequenza di basi presente sul tratto di DNA analizzato mediante una lettura a fluorescenza

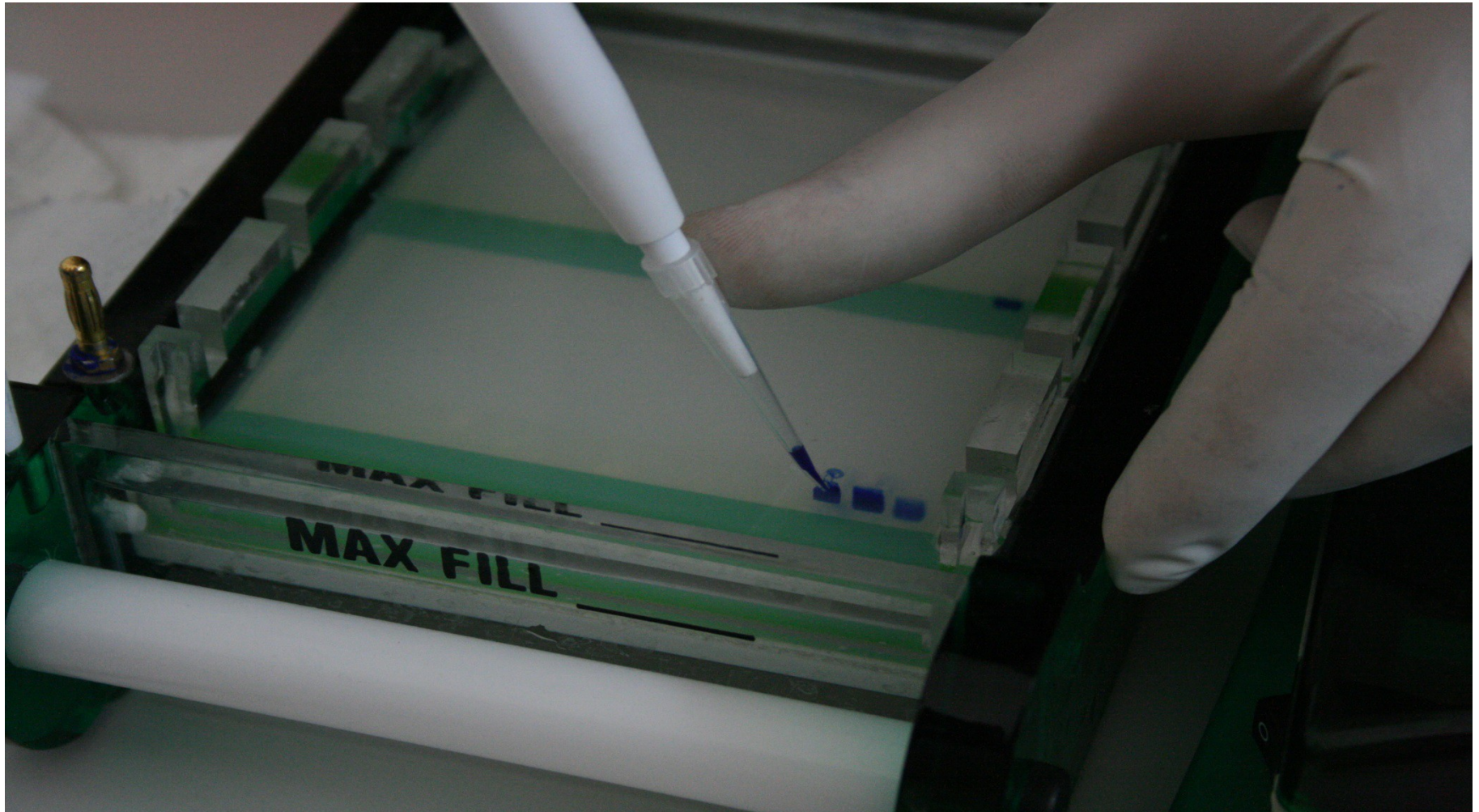


V INCONTRO: verifica della retromutazione (pcr, sequenziamento,

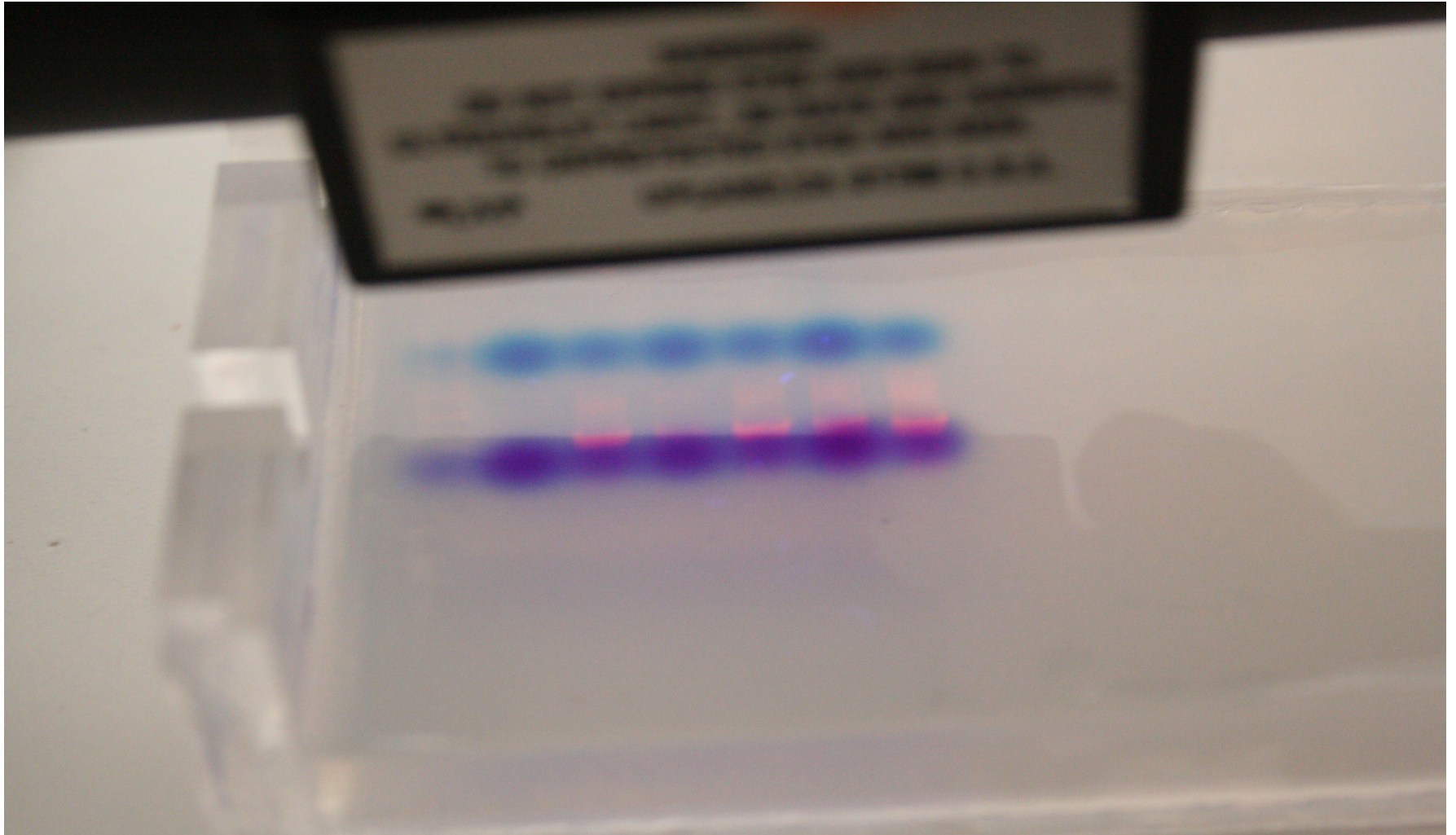


**Abbiamo
eseguito
l'elettoreforesi
su gel del
DNA
amplificato
con PCR per
confermare
l'avvenuta
amplificazione
dei segmenti
di interesse**

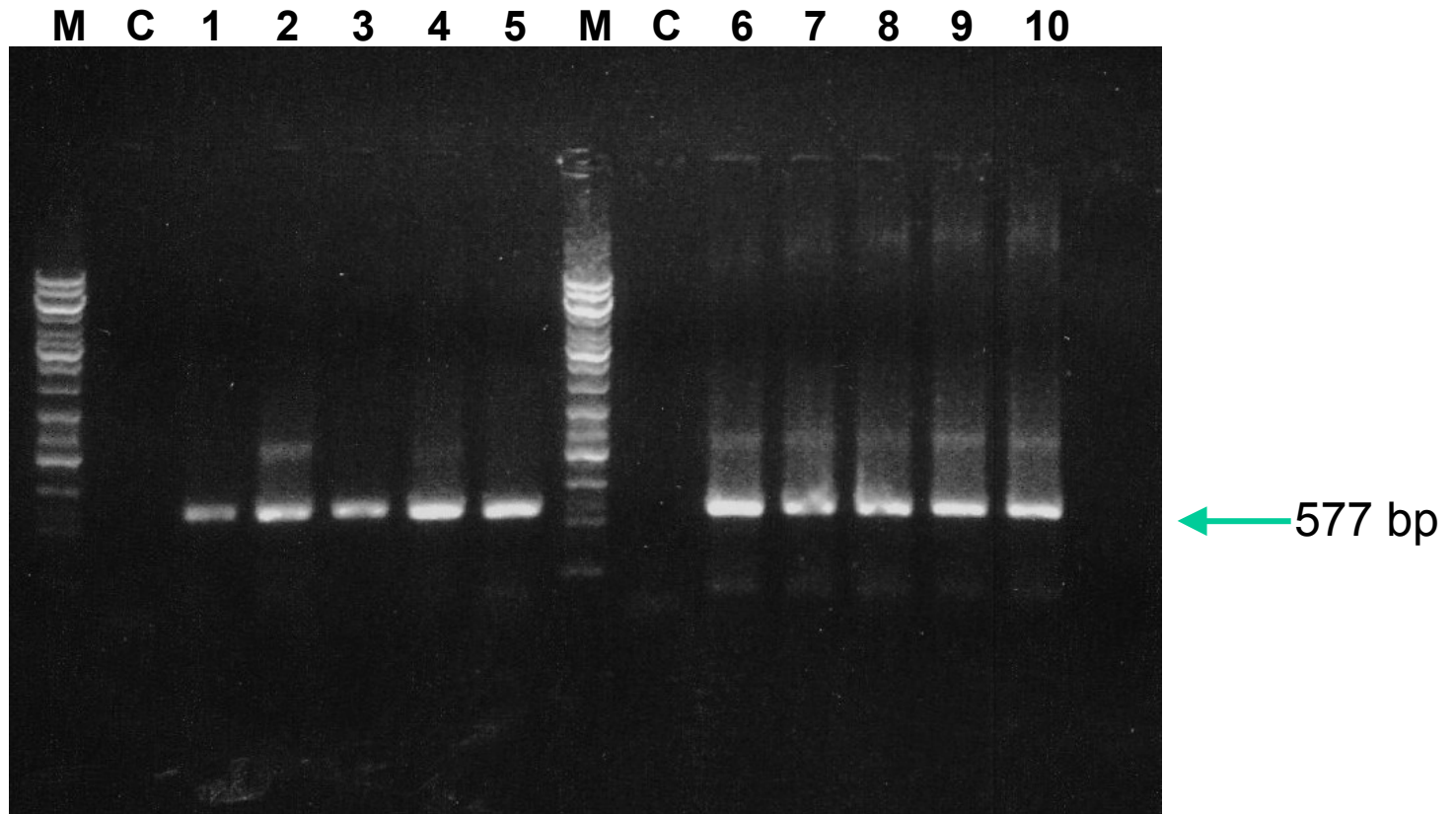
V INCONTRO: elettroforesi del DNA ottenuto dalla PCR

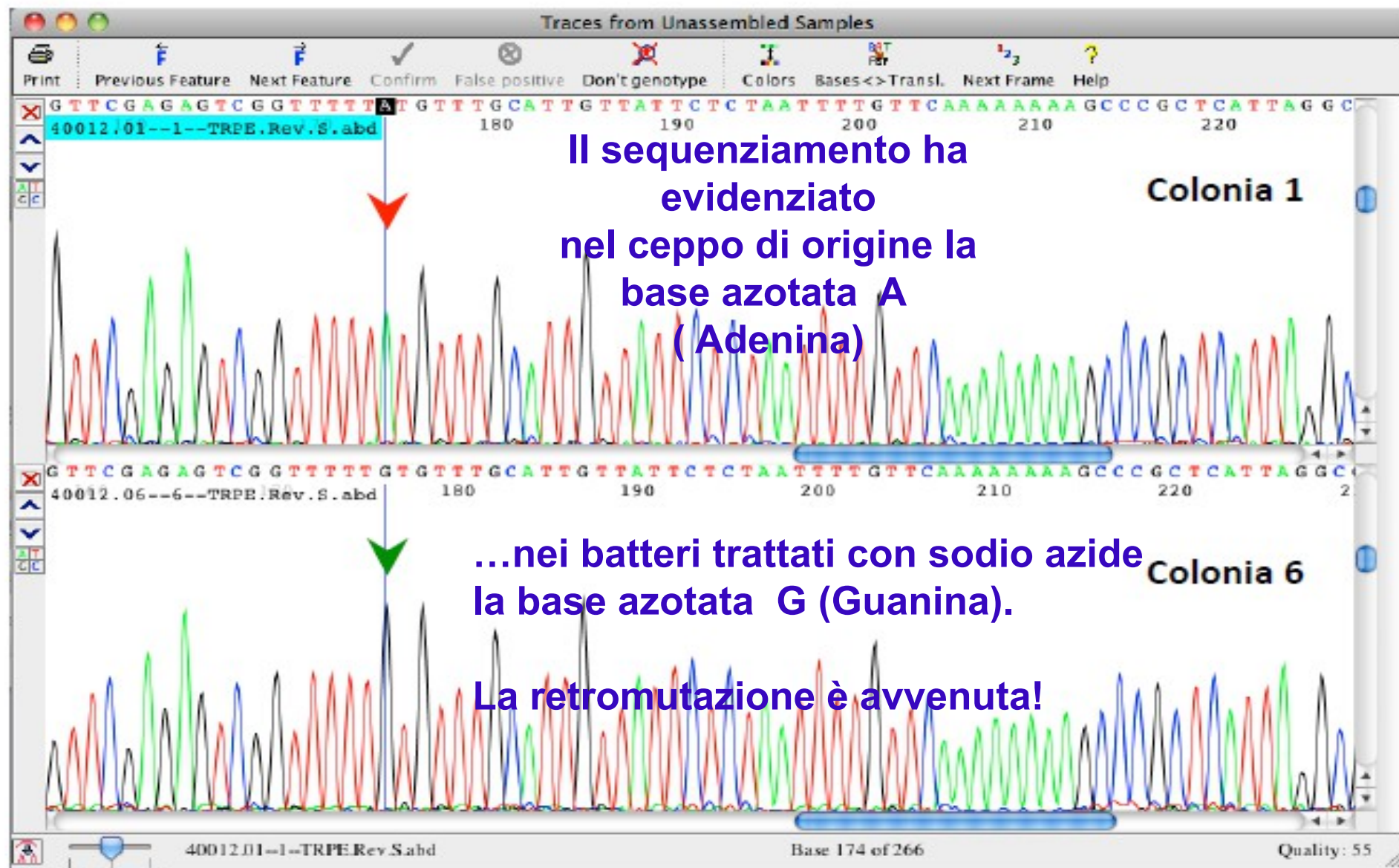


V INCONTRO: elettroforesi del DNA ottenuto dalla PCR



**...e, dopo l'esecuzione della PCR, l'elettroforesi
dei prodotti ha consentito l'individuazione dei
segmenti d'interesse amplificati per procedere al
sequenziamento**





N.B.: le sequenze sono "reverse"

verifica della retromutazione

1
2
3
4
5
6
7
8
9

TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
TTGTATTACCATGCGTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT

60
60
60
60
60
60
60
60
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9

TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT
TTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACATATAAAACCGACTCTCGAACAGCTAACCT

120
120
120
120
120
120
120
120
120

1
2
3
4
5
6
7
8
9

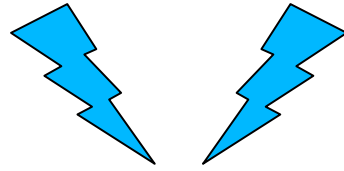
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC
GCGAAGGCGCTTATCGCGACAATCCCACCGCGCTTTTTTACCAGTTGTGTGGGGATCGTC

180
180
180
180
180
180
180
180
180

Per un'ulteriore
riprova
ci siamo collegati
con il
sito CLUSTAL W2
che ci ha consentito
di confrontare
l'intera sequenza di
basi delle diverse
colonie batteriche,
leggendole dal
filamento
antiparallelo al
precedente.

Nel riquadro
sono
riconoscibili le
basi azotate T
della tripletta
TAA e C della
tripletta CAA

Sodio azide



Colonie 1-5

(mutanti originari)

Gene	ATG	CAA	ACA	TAA	AAA	CCG	ACT	CTC	GAA	CAG	CTA	ACC	...
Proteina	Met	Gln	Thr	Stop!									
Codone	1	2	3										



Colonie 6-9

(retro-mutanti = *E. coli* wild-type)

Gene	ATG	CAA	ACA	CAA	AAA	CCG	ACT	CTC	GAA	CAG	CTA	ACC	...
Proteina	Met	Gln	Thr	Gln	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	...
Codone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	...

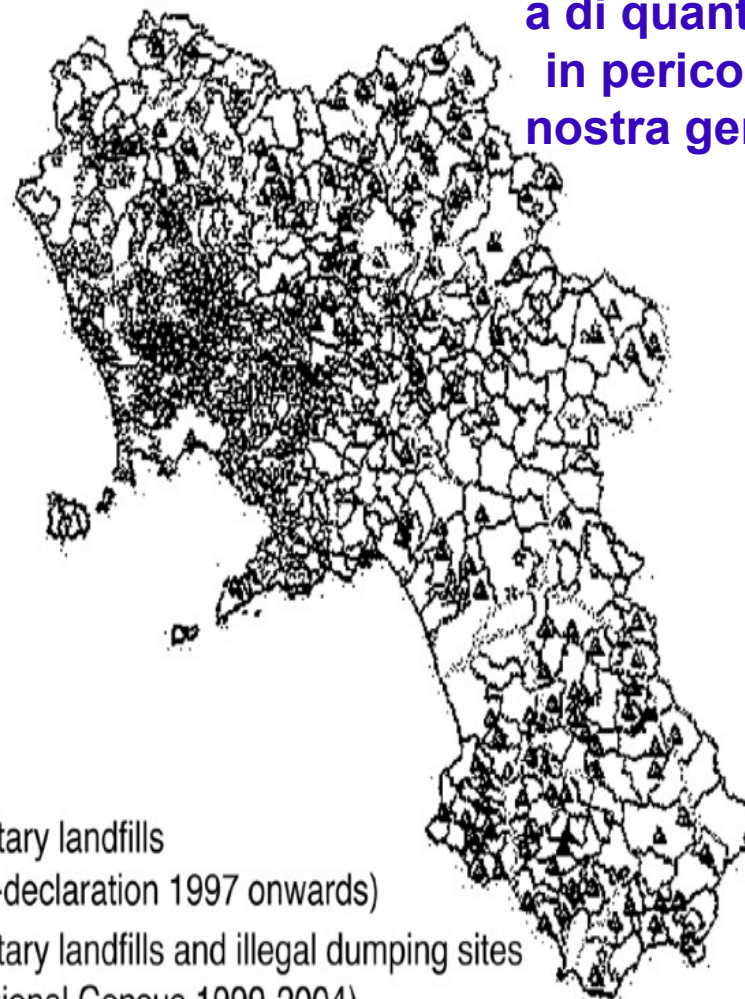
Inquinamento in Campania

TERRITORI MAGGIORMENTE INQUINATI

Le sette aree vaste



B



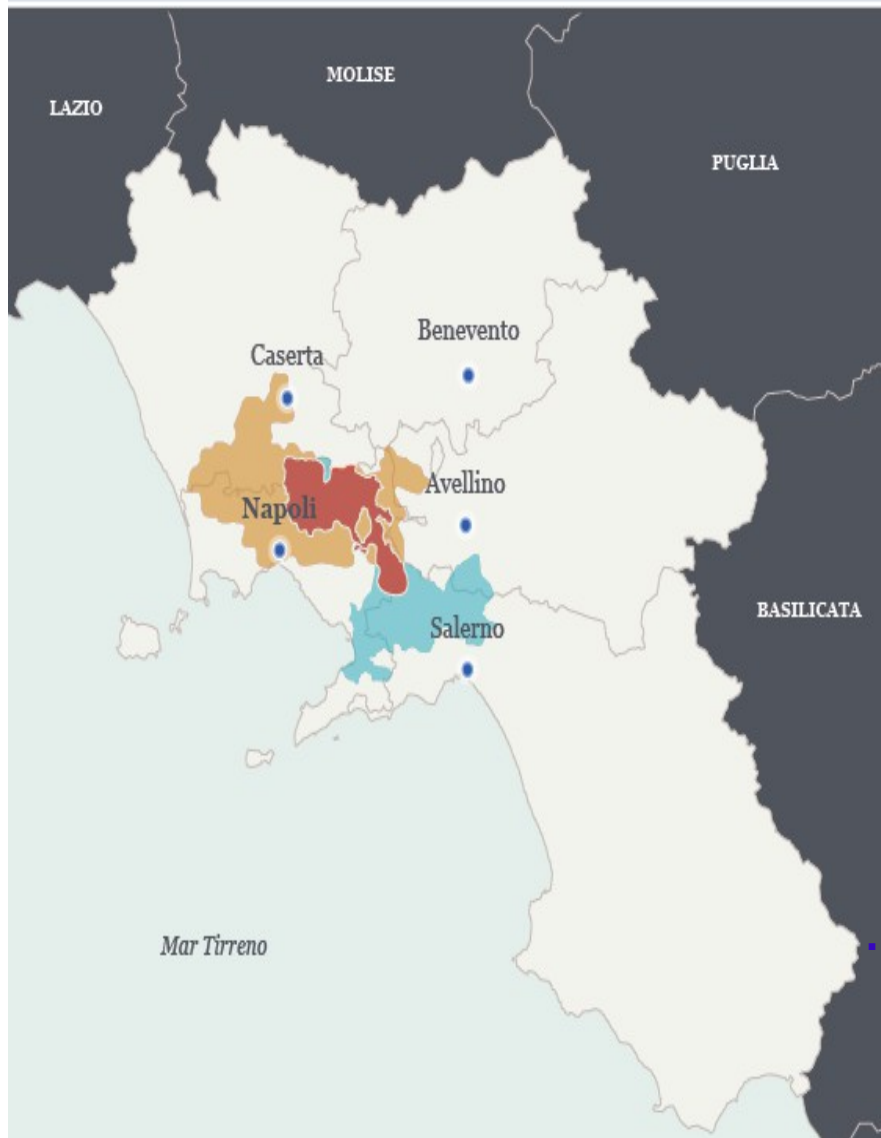
- ▲ Sanitary landfills (self-declaration 1997 onwards)
- ✱ Sanitary landfills and illegal dumping sites (Regional Census 1999-2004)

Questo progetto è nato dalla consapevolezza di quanto sia in pericolo la nostra gente...

Inquinamento e Produzione in Campania

2. Pomodoro San Marzano DOP

● Area di produzione ● Terra dei fuochi ● Produzione nella Terra dei fuochi



2. Mozzarella di Bufala Campana DOP

● Area di produzione ● Terra dei fuochi ● Produzione nella Terra dei fuochi



.....Sottoposta all'azione
incontrollata
di sostanze tossiche...
...e di ciò che l'uomo fa

***"Questo noi sappiamo:
la terra non appartiene
all'uomo, è l'uomo che
appartiene alla terra.
Tutte le cose sono
collegate, come il sangue
che unisce una famiglia.
Non è stato l'uomo a
tessere la tela della vita,
egli ne è soltanto un filo.
Qualunque cosa egli
faccia alla tela, lo fa a se
stesso".***

***(Capo Seattle – 1854 - lettera
al Presidente degli Stati Uniti
Franklin Pierce)***

