Verifica di fine parte III

Scienze naturali 5 · Parte III · Le biotecnologie · versione 1.0
Verifica: Verifica di fine parte III · pagine 377–382 del volume completo · estratto per lo studio

Le biotecnologie (parte III: capitoli 12–13). Tempo: 80 minuti. Punteggio totale: 100 punti. Puoi usare la calcolatrice e le tavole dell'appendice. Nei calcoli scrivi i passaggi e indica le unità di misura; dai i risultati con un numero ragionevole di cifre significative. I dati dei problemi sono di esempio.

Punteggio. Scelta multipla: 2 punti per ogni risposta corretta (20 punti). Vero o falso: 2 punti ciascuno; 1 punto se la risposta è giusta ma la correzione dell'affermazione falsa manca o è sbagliata (10 punti). Applicare: 5 punti ciascuno, di cui 3 per l'impostazione e i passaggi e 2 per il risultato corretto (30 punti). Leggere i dati: 15 punti, ripartiti come indicato nella domanda. Indagare e argomentare: 5 punti ciascuno, 2 per i concetti scientifici corretti, 2 per la completezza del ragionamento, 1 per la chiarezza e il lessico specifico (25 punti).

Comprendere e ricordare (10 × 2 punti)

1. ● BamHI riconosce il sito 5′-G^GATCC-3′ (^ = punto di taglio). Il taglio produce
   - **A.** estremità piatte
   - **B.** estremità coesive con una sporgenza 3′ di quattro basi
   - **C.** estremità coesive con una sporgenza 5′ GATC
   - **D.** un taglio su un solo filamento

2. ●● Dopo un clonaggio con screening blu/bianco, su un terreno con ampicillina e X-gal, una colonia bianca contiene di solito
   - **A.** un plasmide con l'inserto, che ha interrotto il gene *lacZ*
   - **B.** nessun plasmide
   - **C.** un plasmide richiuso senza inserto
   - **D.** un plasmide senza gene di resistenza

3. ●● Si amplifica con la PCR un tratto di un DNA genomico umano. Dopo una trentina di cicli, quasi tutto il DNA a doppio filamento nella provetta è formato da
   - **A.** copie dell'intero genoma umano
   - **B.** frammenti di lunghezza casuale, copiati da punti diversi dello stampo
   - **C.** primer appaiati fra loro
   - **D.** molecole lunghe esattamente quanto il tratto compreso fra i due primer

4. ●● Nell'elettroforesi su gel di agarosio il DNA migra verso il polo positivo perché
   A. le basi azotate sono cariche positivamente
   B. i gruppi fosfato lo caricano negativamente
   C. l'agarosio lo respinge
   D. i frammenti corti sono più pesanti

5. ●●● Un RNA guida ha la stessa sequenza di un tratto di 20 nucleotidi del gene bersaglio, seguito da una PAM. In un altro cromosoma c'è un tratto che differisce da questo per una sola base ed è anch'esso seguito da una PAM. Che cosa può succedere?
   A. Cas9 taglia soltanto il gene bersaglio, perché la guida è identica solo a quello
   B. Cas9 non taglia nessuno dei due tratti, perché la guida ne riconosce due
   C. Cas9 può tagliare anche il secondo tratto: è un effetto fuori bersaglio
   D. la cellula ripara il taglio nel gene bersaglio copiando il secondo tratto

6. ● Il vaccino ricombinante contro l'epatite B contiene
   A. il virus intero inattivato
   B. un mRNA in nanoparticelle lipidiche
   C. il genoma del virus
   D. la proteina di superficie del virus, prodotta da un lievito

7. ● Il Golden Rice contiene geni che gli fanno produrre nel chicco
   A. β-carotene, il precursore della vitamina A
   B. una proteina Cry tossica per alcuni insetti
   C. un enzima che lo rende tollerante a un erbicida
   D. più proteine, per combattere la malnutrizione

8. ●● Nella trasformazione delle piante con *Agrobacterium tumefaciens*
   A. tutto il plasmide Ti si integra nel cromosoma della pianta
   B. il T-DNA, compreso fra i suoi bordi, si integra in un cromosoma della cellula vegetale
   C. il gene di interesse resta nel batterio
   D. il T-DNA si integra sempre nello stesso punto del genoma

9. ●●● Una pianta di melo riceve, con le sue sequenze regolatrici, un gene di resistenza preso da una varietà selvatica di melo. Si tratta di
   A. transgenesi
   B. clonazione per trasferimento nucleare
   C. selezione artificiale
   D. cisgenesi

10. ●● Prima di prescrivere l'abacavir, un farmaco contro l'HIV, si verifica se il paziente porta la variante HLA-B*57:01, perché
    A. il farmaco funziona solo nei portatori della variante
    B. la variante rende il virus resistente al farmaco
    C. nei portatori della variante il farmaco può scatenare una grave reazione di ipersensibilità
    D. la variante fa eliminare il farmaco troppo in fretta

Vero o falso (5 × 2 punti; correggi le affermazioni false)

11. ● In una sequenza casuale, un enzima con un sito di riconoscimento di 6 bp taglia in media una volta ogni 4096 bp.

12. ●● In una PCR in tempo reale, un campione che raggiunge la soglia a un ciclo più alto conteneva all'inizio più copie del bersaglio.

13. ●● Le letture lunghe, come quelle dei nanopori, hanno permesso di sequenziare le regioni ripetute del genoma umano che le letture corte non riuscivano a ricomporre.

14. ● Secondo la normativa europea, una varietà di frumento ottenuta con incroci e selezione artificiale è un OGM.

15. ●● Nel biorisanamento di un suolo inquinato da metalli pesanti, i microrganismi trasformano i metalli in sostanze innocue che non contengono più il metallo.

Applicare (6 × 5 punti)

16. ● Un tratto di DNA lineare di $2{,}0 \times 10^5$ bp viene digerito completamente con HindIII (sito di 6 bp). Supponendo la sequenza casuale, quanti tagli e quanti frammenti ti aspetti? Come cambierebbe il numero di frammenti se il DNA fosse circolare?

17. ●● Dopo 30 cicli di una PCR ideale un campione contiene $5{,}4 \times 10^9$ copie di un tratto bersaglio. a) Quante copie c'erano all'inizio? b) In una PCR reale, dopo altri 5 cicli, le copie non sono $2^5 = 32$ volte di più. Perché?

18. ●●● In una RT-PCR in tempo reale il campione di un paziente raggiunge la soglia al ciclo 24. a) Il campione di un secondo paziente contiene circa 1000 volte meno RNA virale: a quale ciclo ti aspetti che superi la soglia (efficienza 100 %)? Il risultato è positivo? b) Perché, per un virus a RNA, prima della PCR serve la trascrittasi inversa?

19. ●●● Un frammento di DNA tagliato alle due estremità con BamHI (G^GATCC) viene inserito in un plasmide aperto con BglII (A^GATCT). a) Perché le estremità si possono appaiare e la DNA ligasi le può saldare? b) Scrivi, da 5′ a 3′ sul filamento superiore, le sei basi che si formano in ciascuna delle due giunzioni. c) Il frammento si potrà poi staccare tagliando il plasmide ricombinante con BamHI o con BglII? Motiva.

20. ●●● In una popolazione, a ciascun locus STR di un profilo il genotipo ha una frequenza di circa 0,10 (dati di esempio). a) Quanti loci servono, come minimo, perché la probabilità di coincidenza casuale scenda sotto 1 su un miliardo? b) In Italia, circa $5{,}9 \times 10^7$ abitanti, quante persone ci si aspetta che abbiano per caso lo stesso profilo con i 12 loci dello standard europeo e con i 20 di quello statunitense? c) Su quale ipotesi si basa la moltiplicazione delle frequenze, e come si scelgono i loci perché sia rispettata?

21. ●●● Dopo un disastro si confrontano i profili di due resti, R1 e R2, con quelli di una coppia che cerca il figlio. Madre: D3S1358 14, 16; vWA 15, 19; FGA 21, 23; TH01 6, 8. Padre: D3S1358 15, 17; vWA 16, 18; FGA 22, 25; TH01 7, 9. R1: D3S1358 16, 17; vWA 15, 18; FGA 23, 25; TH01 8, 9. R2: D3S1358 14, 15; vWA 17, 19; FGA 21, 22; TH01 6, 6. a) Quale dei due resti può appartenere al figlio della coppia? b) A quali loci è escluso l'altro? Spiega in particolare il locus TH01. c) Perché, prima di escludere una parentela, si richiede che i loci incompatibili siano almeno due?

Leggere i dati (15 punti)

Un laboratorio di controllo vuole sapere se alcune farine di mais contengono mais Bt. Estrae il DNA e lo amplifica con due coppie di primer: una per un tratto del transgene *cry*, una per un gene che tutte le piante di mais possiedono. Poi separa i prodotti su un gel di agarosio. Le distanze percorse dalle bande sono nella tabella seguente (dati di esempio).

Pozzetto	Campione	Bande (distanza dal pozzetto, mm)
M	scala di riferimento: 1000, 700, 500, 300, 200, 100 bp	30,0; 36,2; 42,0; 50,9; 58,0; 70,0
1	mais Bt certificato (controllo positivo)	43,9; 54,1
2	mais convenzionale certificato (controllo negativo)	43,9
3	farina A	43,9; 54,1
4	farina B	43,9
5	acqua al posto del DNA	nessuna banda
6	farina C	nessuna banda

22. ●● a) Con la scala di riferimento, stima la lunghezza delle due bande a 43,9 mm e a 54,1 mm, interpolando sul logaritmo fra le bande vicine (4 punti). b) Quale delle due bande corrisponde al transgene, e quale al gene del mais? Motiva (2 punti). c) Quali farine contengono mais Bt? (2 punti) d) A che cosa servono il pozzetto 5 e la banda del gene del mais? Che cosa concludi sulla farina C? (4 punti) e) Questa PCR dice se c'è mais Bt, non quanto. Quale tecnica useresti per stimarne la quantità, e perché nell'Unione europea può essere importante saperlo, sapendo che la presenza accidentale di OGM autorizzati sotto lo 0,9 % di un ingrediente non obbliga all'etichetta? (3 punti)

Indagare e argomentare (5 × 5 punti)

23. ●● Per far produrre a *E. coli* una proteina umana servono un cDNA e un vettore di espressione. Spiega perché non basta il gene preso dal genoma e qual è il ruolo, nel vettore, dell'origine di replicazione, del marcatore di selezione e del promotore.

24. ●●● In cellule in coltura vuoi correggere con CRISPR-Cas9 una singola base mutata in un gene. Spiega perché non basta lasciare che la cellula ripari il taglio come capita, che cosa devi fornire oltre a Cas9 e all'RNA guida e quale via di riparazione sfrutti, quale alternativa senza taglio a doppio filamento potresti usare, e come verifichi la correzione e l'assenza di effetti fuori bersaglio.

25. ●● Confronta la terapia genica dell'ADA-SCID autorizzata nell'Unione europea e quella di una forma ereditaria di cecità con un vettore AAV iniettato sotto la retina: dove vengono modificate le cellule e con quale vettore, quale limite ha un AAV quando il gene è molto lungo, e perché in nessuno dei due casi la modifica passa ai figli del paziente.

26. ●●● In Italia è vietato coltivare il mais Bt autorizzato dall'Unione europea, mentre si importano mangimi da mais e soia GM. Distingui le domande scientifiche, economiche ed etiche che questa situazione solleva, indicando per ciascuna quali prove o quali scelte servirebbero per rispondere.

27. ●●● La prima terapia basata su CRISPR per l'anemia falciforme e l'esperimento del 2018 sulle gemelle modificate nel gene *CCR5* usano lo stesso strumento. Spiega perché la prima è stata autorizzata e il secondo è stato condannato, usando i concetti di cellule somatiche e linea germinale, di consenso informato e l'articolo 13 della Convenzione di Oviedo.

Soluzioni

1. C (2 punti). Il taglio fra G e G, sfalsato sui due filamenti, lascia sporgenze 5′ di quattro basi, GATC.

2. A (2 punti). L'inserto interrompe *lacZ*: niente β-galattosidasi, X-gal non diventa blu. L'ampicillina garantisce che la colonia abbia un plasmide.

3. D (2 punti). I primer si appaiano soltanto alle loro sequenze complementari e la polimerasi copia solo a partire da essi; dal terzo ciclo compaiono i filamenti doppi lunghi esattamente quanto il tratto fra i primer (l'amplicone), che da quel momento si moltiplicano più in fretta di tutto il resto.

4. B (2 punti). I gruppi fosfato dello scheletro sono carichi negativamente; il gel separa per lunghezza.

5. C (2 punti). Cas9 può tagliare anche sequenze simili, ma non identiche, a quella della guida, se sono accanto a una PAM: sono gli effetti fuori bersaglio, che si riducono scegliendo guide uniche nel genoma e si cercano sequenziando le cellule modificate.

6. D (2 punti). È un vaccino a subunità: contiene solo l'antigene di superficie prodotto da un lievito ricombinante, né virus né genoma.

7. A (2 punti). Geni presi da piante e da un batterio fanno produrre β-carotene nel chicco; la sua carenza causa cecità e mortalità infantile nei paesi poveri. La proteina Cry è quella del mais Bt.

8. B (2 punti). Si trasferisce e si integra solo il T-DNA, delimitato dai bordi; il punto di integrazione non è scelto.

9. D (2 punti). Gene della stessa specie o di una incrociabile, con le sue sequenze regolatrici: cisgenesi, una delle NGT.

10. C (2 punti). È un esempio di farmacogenomica: la variante di una molecola del sistema immunitario è associata a una reazione di ipersensibilità che può essere grave, quindi nei portatori il farmaco si evita. La variante riguarda il paziente, non il virus.

11. V (2 punti). $4^6 = 4096$ bp.

12. F (2 punti). È il contrario: più copie iniziali, prima si raggiunge la soglia; un Ct più alto indica meno bersaglio.

13. V (2 punti). La sequenza «completata» nel 2003 copriva circa il 92 % del genoma: mancavano i tratti più ripetuti, come i centromeri. La prima sequenza continua da un telomero all'altro (T2T), pubblicata nel 2022 grazie alle letture lunghe, mancava solo del cromosoma Y, completato l'anno dopo.

14. F (2 punti). Per la direttiva 2001/18/CE un OGM ha materiale genetico modificato in un modo che non avviene in natura con l'accoppiamento o la ricombinazione naturale; incroci e selezione usano la variabilità che c'è e non producono un OGM.

15. F (2 punti). I metalli pesanti non si possono distruggere: alcune piante li assorbono e li concentrano nei tessuti, che poi si raccolgono e si smaltiscono (fitorisanamento). Sono gli idrocarburi, come dopo il naufragio della Exxon Valdez, che i batteri possono degradare.

16. Un sito ogni $4^6 = 4096$ bp: $2{,}0 \times 10^5 / 4096 \approx 49$ tagli. In un DNA lineare i frammenti sono uno in più dei tagli: circa 50. In un DNA circolare sarebbero tanti quanti i tagli, circa 49 (5 punti).

17. a) $N_0 = N/2^{30} = 5{,}4 \times 10^9 / 1\,073\,741\,824 \approx 5$ copie (3 punti). b) Dopo 25–35 cicli si esauriscono i primer e i dNTP, la polimerasi perde attività e i filamenti di amplicone, ormai abbondantissimi, si riappaiano fra loro invece che con i primer: la crescita rallenta fino al plateau (2 punti).

18. a) Servono n cicli in più, con $2^n = 1000$: $n = \log 1000 / \log 2 \approx 10$ (equivalente: 3,3 cicli per ogni fattore 10, $3 \times 3{,}3 \approx 10$). Il secondo campione supera la soglia intorno al ciclo 34: prima di 40 cicli, quindi è positivo, con poco RNA virale (3 punti). b) La Taq copia solo DNA: l'RNA del virus va prima ricopiato in cDNA dalla trascrittasi inversa (2 punti).

19. a) I due enzimi lasciano la stessa sporgenza 5′ GATC, che è complementare a sé stessa: le estremità si appaiano e la ligasi forma i legami fosfodiesterici (1 punto). b) Da un lato il plasmide finisce con ...A e il frammento comincia con GATCC...: 5′-AGATCC-3′; dall'altro il frammento finisce con ...G e il plasmide continua con GATCT...: 5′-GGATCT-3′ (2 punti). c) No: AGATCC e GGATCT non sono né il sito di BamHI (GGATCC) né quello di BglII (AGATCT). Le giunzioni non sono più tagliate da nessuno dei due enzimi; per staccare il frammento servono altri siti (2 punti).

20. a) $P = 0{,}10^n < 10^{-9}$ richiede $n > 9$: almeno 10 loci (con 9 si arriva esattamente a 10^{-9}) (2 punti). b) 12 loci: $5{,}9 \times 10^7 \times 10^{-12} \approx 6 \times 10^{-5}$ persone; 20 loci: $5{,}9 \times 10^7 \times 10^{-20} \approx 6 \times 10^{-13}$. In entrambi i casi ci si aspetta che nessun'altra persona abbia per caso lo stesso profilo (2 punti). c) Che i loci si ereditino in modo indipendente: si scelgono su cromosomi diversi o lontani sullo stesso cromosoma. Il calcolo non vale per un gemello monozigote e meno per i parenti stretti (1 punto).

21. a) R1: a ogni locus ha un allele della madre e uno del padre (D3S1358 16 + 17, vWA 15 + 18, FGA 23 + 25, TH01 8 + 9). È compatibile, non identificato con certezza: servono più loci e il calcolo della probabilità (2 punti). b) R2 è escluso a due loci: vWA (17, 19: il 19 può venire dalla madre, ma il padre non ha il 17) e TH01 (6, 6: è omozigote, quindi ha ricevuto un 6 da ciascun genitore, ma il padre ha 7 e 9). Agli altri due loci è compatibile (2 punti). c) A un singolo locus l'allele può essere cambiato per una mutazione nel passaggio dal genitore al figlio: un solo locus incompatibile non basta a escludere (1 punto).

22. a) Banda a 43,9 mm, fra 500 bp (42,0 mm) e 300 bp (50,9 mm): frazione $(43{,}9 - 42{,}0)/(50{,}9 - 42{,}0) = 0{,}21$; $\log L = 2{,}699 + 0{,}21 \times (2{,}477 - 2{,}699) \approx 2{,}652$, $L \approx 450$ bp. Banda a 54,1 mm, fra 300 bp e 200 bp (58,0 mm): frazione $3{,}2/7{,}1 = 0{,}45$; $\log L = 2{,}477 + 0{,}45 \times (2{,}301 - 2{,}477) \approx 2{,}398$, $L \approx 250$ bp (4 punti). b) La banda di circa 450 bp c'è in tutti i campioni di mais, compreso il convenzionale: è il gene del mais; quella di circa 250 bp c'è nel controllo positivo e manca nel controllo negativo: è il transgene (2 punti). c) La farina A. La farina B no: la banda del gene del mais dice che il suo DNA è stato amplificato, ma il transgene non c'è (2 punti). d) Il pozzetto 5 (acqua) controlla che i reagenti non siano contaminati: nessuna banda, quindi i risultati positivi non sono dovuti a contaminazione. Il gene del mais è un controllo interno: dimostra che il DNA è stato estratto e amplificato. Nella farina C manca anche questa banda: il test è fallito (DNA degradato o inibitori) e il risultato non è valutabile, non è un «negativo»; va ripetuto (4 punti). e) La PCR in tempo reale: il ciclo soglia permette di stimare la quantità iniziale di DNA transgenico rispetto al gene del mais. Nell'UE gli alimenti con OGM autorizzati vanno etichettati, ma una presenza accidentale sotto lo 0,9 % dell'ingrediente non obbliga all'etichetta: per decidere serve la quantità (3 punti).

23. Traccia (5 punti): i geni umani contengono introni, che i batteri non sanno rimuovere: si usa il cDNA, copiato dall'mRNA maturo con la trascrittasi inversa. Nel vettore l'origine di replicazione permette al plasmide di essere copiato e mantenuto nelle cellule figlie; il marcatore di selezione (per esempio la resistenza a un antibiotico) permette di far crescere solo i batteri che hanno ricevuto il plasmide; il promotore, riconosciuto dalla RNA polimerasi batterica, fa trascrivere il cDNA in mRNA, che il batterio traduce nella proteina.

24. Traccia (5 punti): la via più rapida, la NHEJ, riattacca le estremità aggiungendo o togliendo spesso qualche base: non corregge, anzi di solito spegne il gene. Per correggere si fornisce uno stampo di DNA con la base giusta, affiancata da tratti uguali a quelli intorno al taglio, e si sfrutta l'HDR, precisa ma meno frequente, soprattutto nelle cellule che non si dividono; la guida va scelta accanto a una PAM vicina alla mutazione. Alternativa: l'editing di base, che trasforma direttamente una base in un'altra senza tagliare i due filamenti. Verifica: PCR del tratto e sequenziamento (Sanger) dei cloni cellulari; sequenziamento dei siti più simili alla guida per gli effetti fuori bersaglio; confronto con cellule trattate con una guida di controllo.

25. Traccia (5 punti): ADA-SCID (Strimvelis): terapia ex vivo; le cellule staminali emopoietiche del paziente, prelevate dal midollo, ricevono in laboratorio con un vettore retrovirale una copia del gene *ADA* e vengono reinfuse; sono del paziente stesso, quindi non c'è rigetto. Cecità: terapia in vivo; il vettore AAV, privato dei suoi geni e poco immunogeno, porta la copia sana del gene direttamente nelle cellule della retina. Un AAV trasporta al massimo circa 4,7 kb di DNA: per un gene grande, come quello della distrofina, non basta. In entrambi i casi si modificano cellule somatiche, non i gameti: la modifica riguarda solo il paziente.

26. Traccia (5 punti): scientifiche: gli alimenti e i mangimi da piante GM autorizzate sono sicuri? quali effetti ha la coltivazione su insetti non bersaglio, resistenze, flusso genico? (risposte da valutazioni del rischio, EFSA, revisioni come quella delle Accademie statunitensi del 2016, prove in campo). Economiche: costi e rese, dipendenza dalle importazioni, brevetti sulle sementi, posizione dei prodotti tipici italiani sul mercato. Etiche e politiche: libertà di scelta di agricoltori e consumatori, principio di precauzione, coerenza fra divieto di coltivazione e importazione. Le prime si risolvono con dati, le altre con scelte che dipendono da valori e interessi (direttiva 2015/412).

27. Traccia (5 punti): la terapia per l'anemia falciforme modifica ex vivo le cellule staminali emopoietiche del paziente (cellule somatiche), interrompendo una sequenza regolatrice che accende il gene *BCL11A* e riattivando così l'emoglobina fetale: la modifica riguarda solo lui, che ha dato il consenso, e cura una malattia grave dopo sperimentazioni controllate. Nel 2018 furono modificati embrioni, cioè la linea germinale: le modifiche passano ai discendenti, senza necessità medica, con rischio di effetti fuori bersaglio, consenso ottenuto in modo scorretto e persone che non potevano scegliere. L'art. 13 della Convenzione di Oviedo ammette interventi sul genoma solo a scopo preventivo, diagnostico o terapeutico e solo se non mirano a modificare il genoma dei discendenti.