

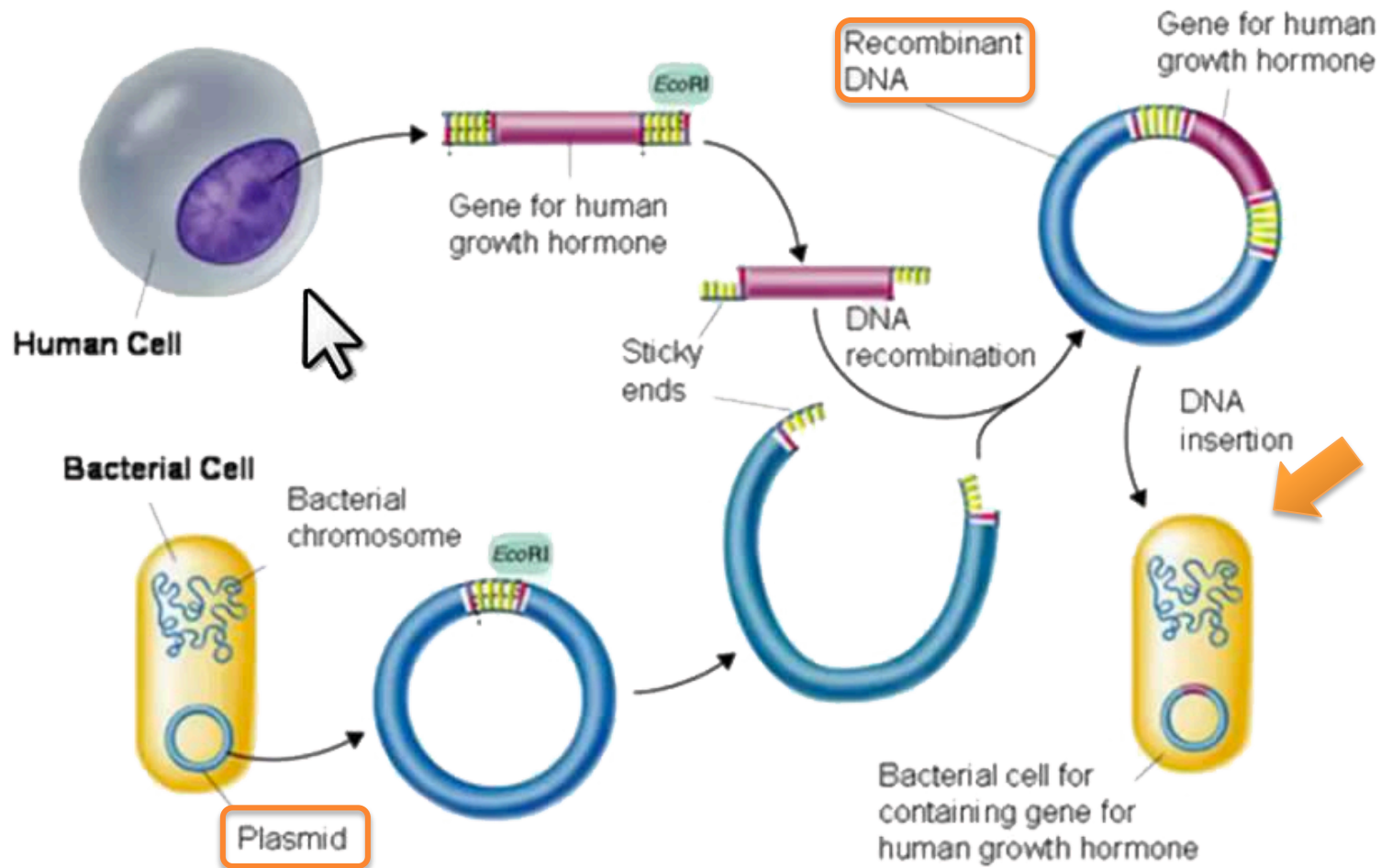
# Clonaggio di geni

- In biologia clonare un organismo implica l'utilizzo della riproduzione asessuale per ottenere organismi **geneticamente identici** fra loro e identici ai loro "genitori".
- Questo concetto è stato esteso ai geni: clonare un tratto di DNA significa ottenere una popolazione di molecole di DNA **identiche alla molecola di partenza**.

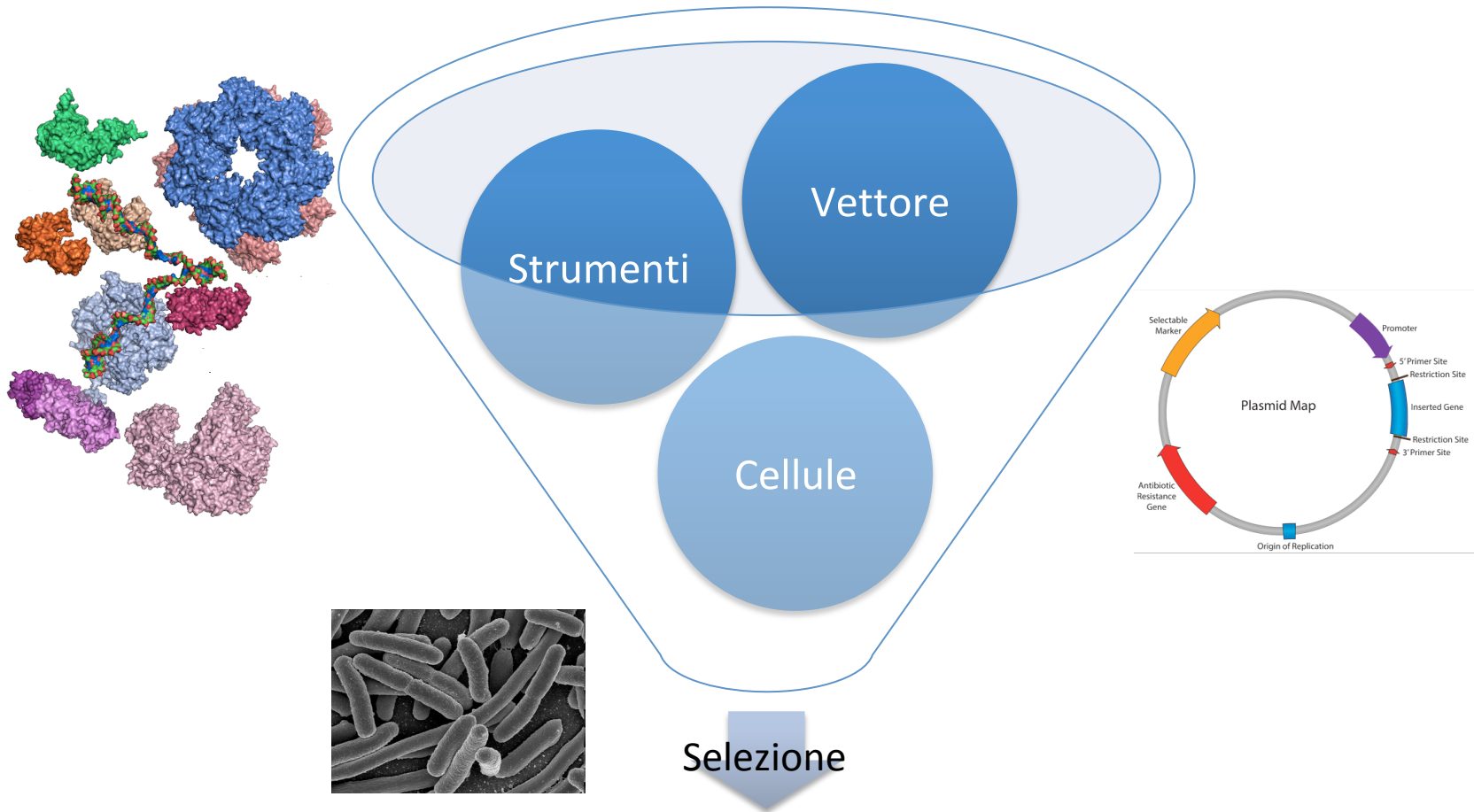
## Perché clonare un gene

- Sequenziarlo;
- Utilizzarlo come sonda per studiarne l'espressione nell'organismo da cui deriva (previa marcatura);
- Esprimere il suo prodotto proteico;
- Mutagenizzarlo e studiare gli effetti delle modificazioni indotte sulle caratteristiche del gene;
- Iniettarlo in una cellula uovo di topo producendo una linea transgenica.

# Tecnologia del DNA ricombinante e clonaggio genico



# Clonaggio in-vivo

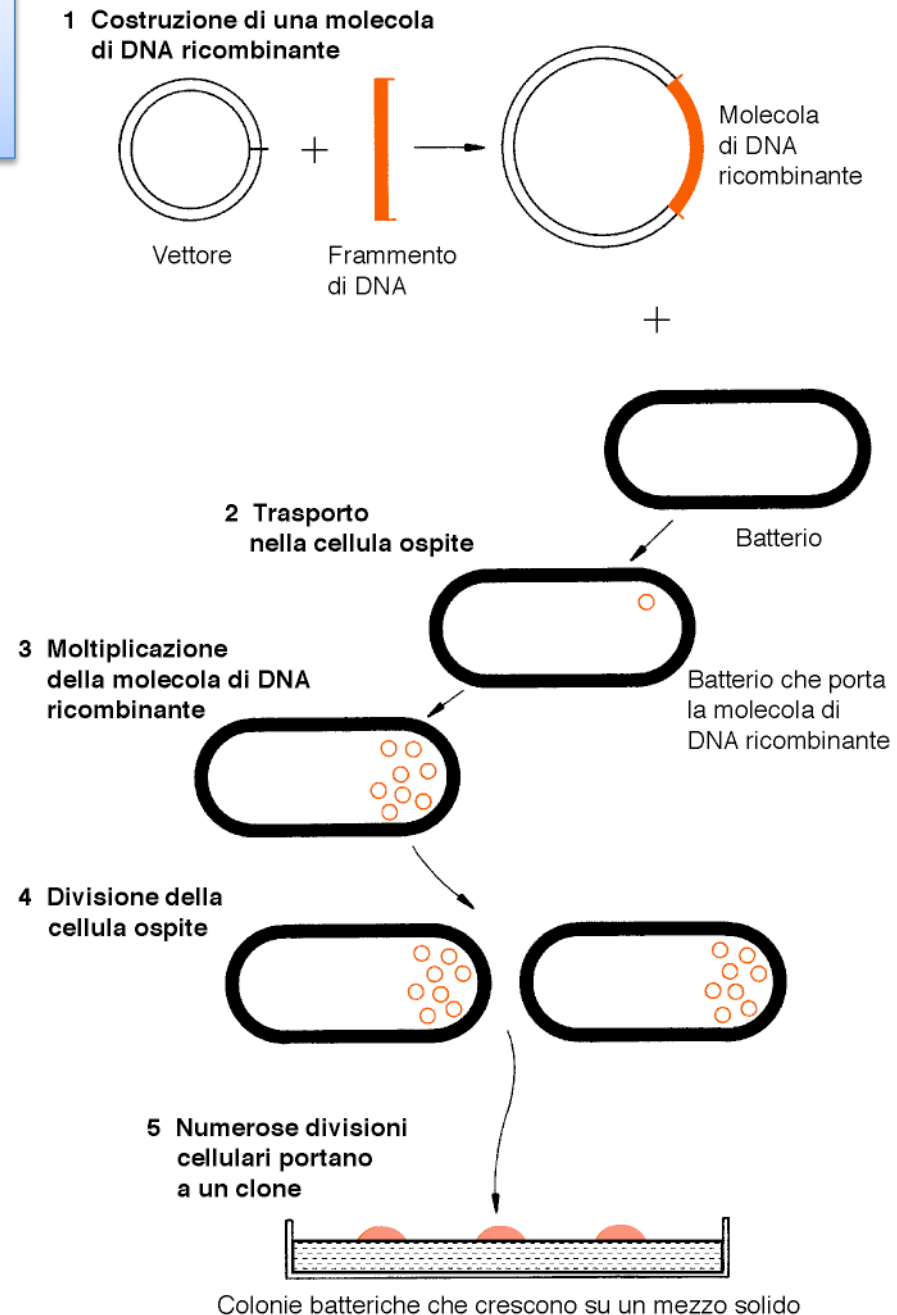


DNA ricombinante



## Clonaggio di un frammento di DNA in un sistema cellulare

- viene generata una molecola di DNA ricombinante, costituita da un vettore (una unità di DNA capace di replicarsi) e il frammento di DNA da clonare (es un gene).
- Questa molecola di DNA ricombinante viene introdotta in un sistema cellulare appropriato (in genere batteri).
- Il vettore si moltiplica nella cellula ospite
- Tutti i discendenti di questa singola cellula, produrranno una colonia o clone, le cui cellule conterranno la medesima molecola di DNA ricombinante



# CLONAGGIO

- Estrazione del DNA
- Costruzione delle molecole di DNA ricombinante
- Trasformazione
- Selezione della colonia di interesse
- Espansione
- Purificazione del DNA plasmidico

1 Costruzione di una molecola di DNA ricombinante



# Enzimi per la manipolazione del DNA

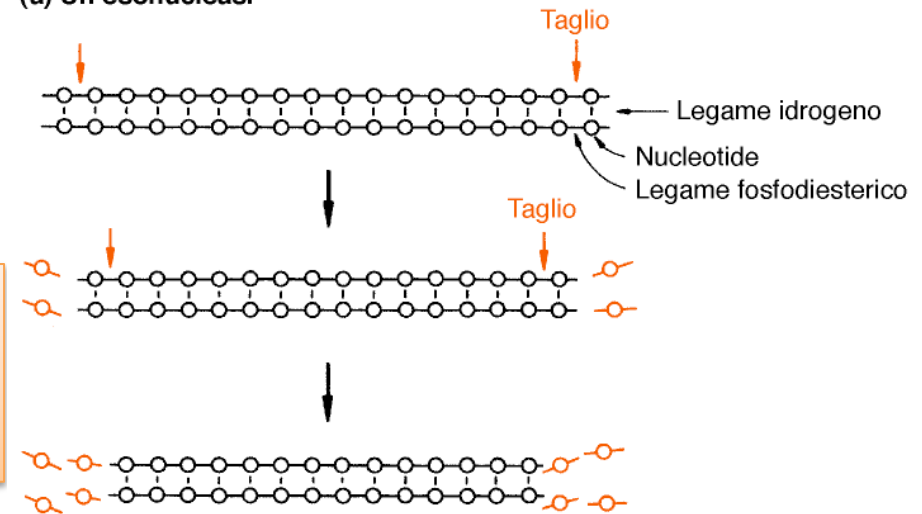
- **Nucleasi:** tagliano, accorciano o degradano molecole di acidi nucleici
- **Polimerasi:** producono copie di molecole di acidi nucleici
- **Enzimi di modificazione:** rimuovono o aggiungono gruppi chimici
- **Ligasi:** uniscono molecole di acidi nucleici
- **Topoisomerasi:** sono capaci di cambiare la conformazione di DNA circolari chiusi covalentemente

# Le nucleasi

## Esonucleasi:

- rimuovono un nucleotide alla volta dalle estremità

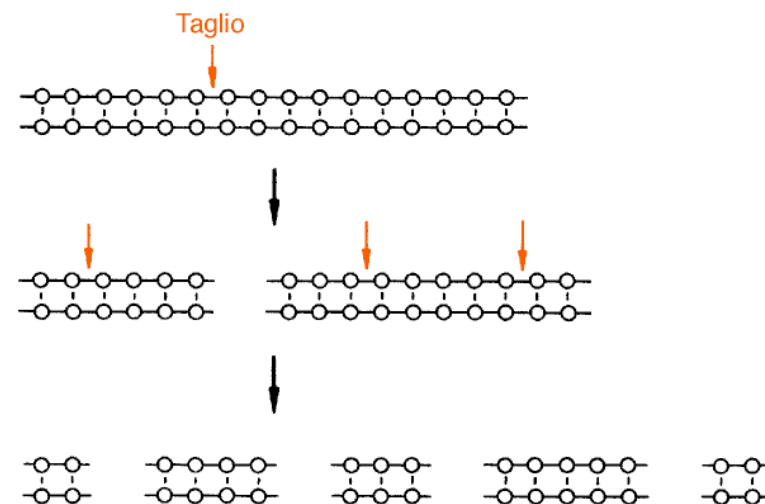
(a) Un'esonucleasi



## Endonucleasi:

- tagliano i legami fosfodiesterici interni del DNA

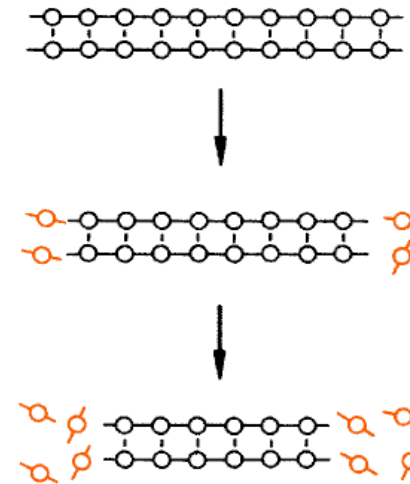
(b) Un'endonucleasi



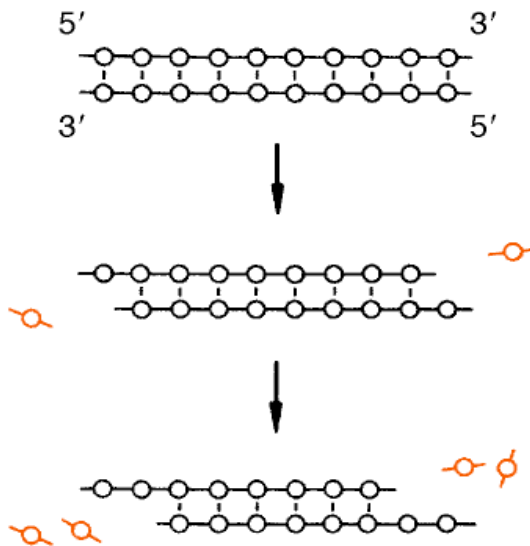
# Tipi di esonucleasi: n° di filamenti su cui agiscono

Bal31 rimuove nucleotidi da entrambi i filamenti di una molecola a doppio filamento

(a) Bal31



(b) Esonucleasi III

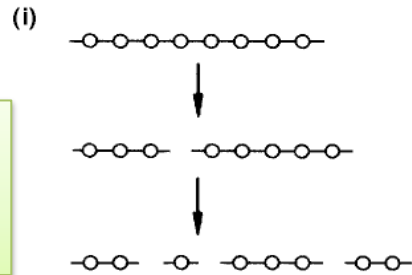


ExoIII rimuove nucleotidi soltanto dal terminale 3'

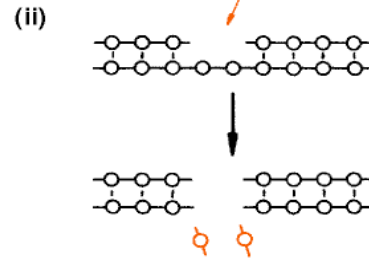


# Tipi di endonucleasi: n° di filamenti su cui agiscono

(a) Nucleasi S1

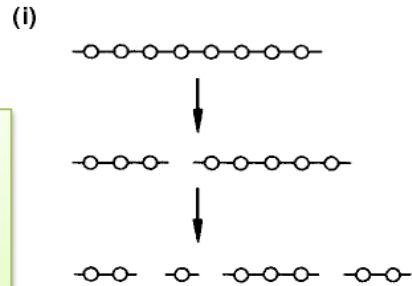


Taglia solo singoli filamenti

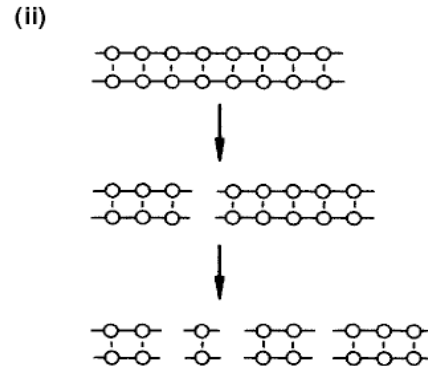


Taglia a doppio filamento in siti di riconoscimento specifici

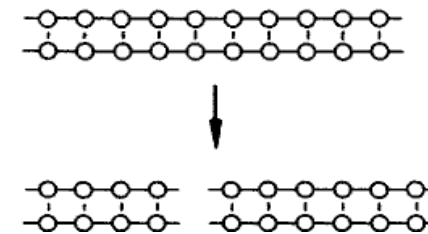
(b) DNasi I



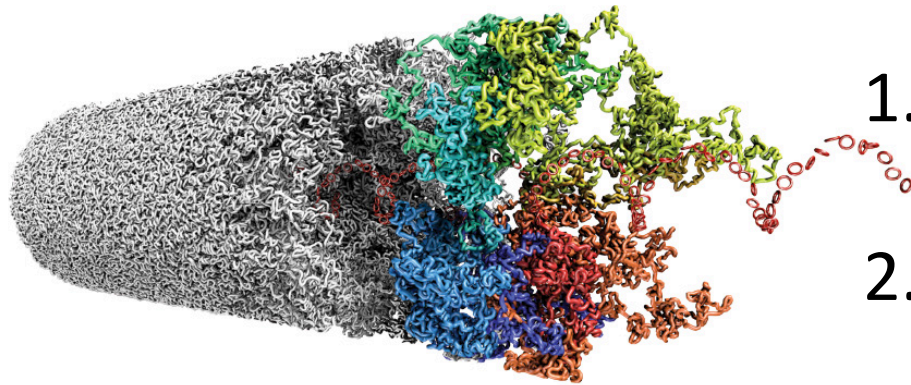
Taglia sia a singolo che a doppio filamento



(c) Un'endonucleasi di restrizione



**Il DNA deve essere tagliato per essere clonato, ma il taglio casuale può non essere soddisfacente!**



1. clonare un genoma

2. clonare un singolo gene



# Endonucleasi di restrizione

- 1960 Arber propone che la capacità dei batteri di resistere all'infezione fagica è dovuto ad alcuni enzimi che ne tagliano il DNA
- Nel 1970 Hamilton O. Smith isolò il primo **enzima di restrizione** (HindIII), un enzima di origine batterica in grado di tagliare molecole di DNA in maniera precisa e riproducibile a livello di siti specifici.
- Inizio dello sviluppo delle tecniche di ingegneria genetica

## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978



Werner Arber  
Prize share: 1/3



Daniel Nathans  
Prize share: 1/3

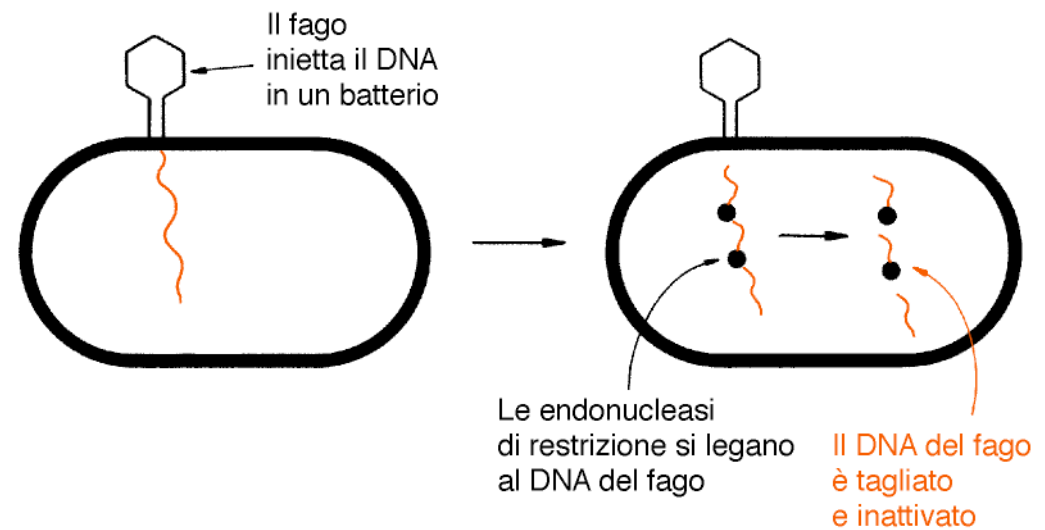


Hamilton O. Smith  
Prize share: 1/3



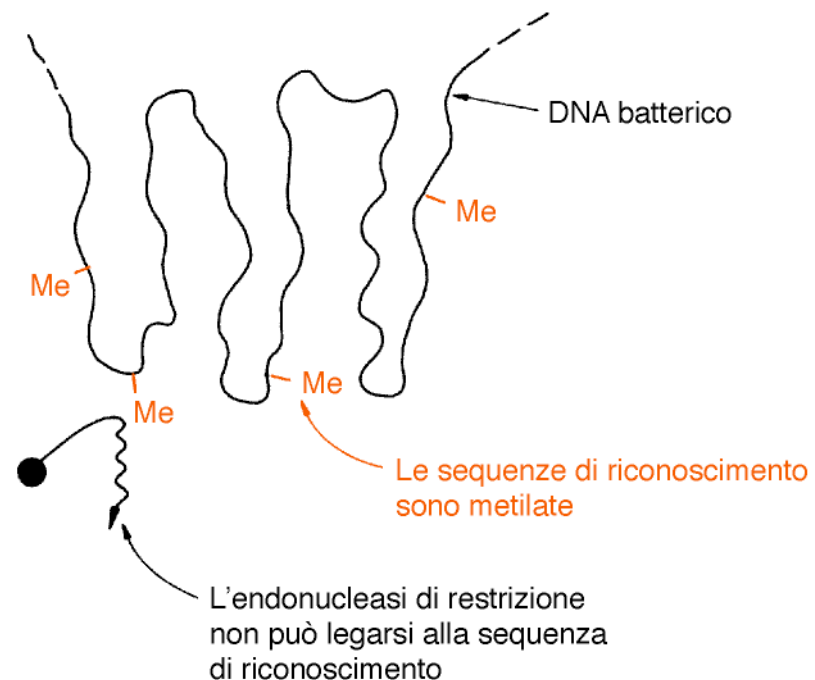
- Gli enzimi di restrizione nei batteri svolgono un ruolo di difesa contro le infezioni virali (**restrizione controllata**).

(a) Restrizione del DNA del fago

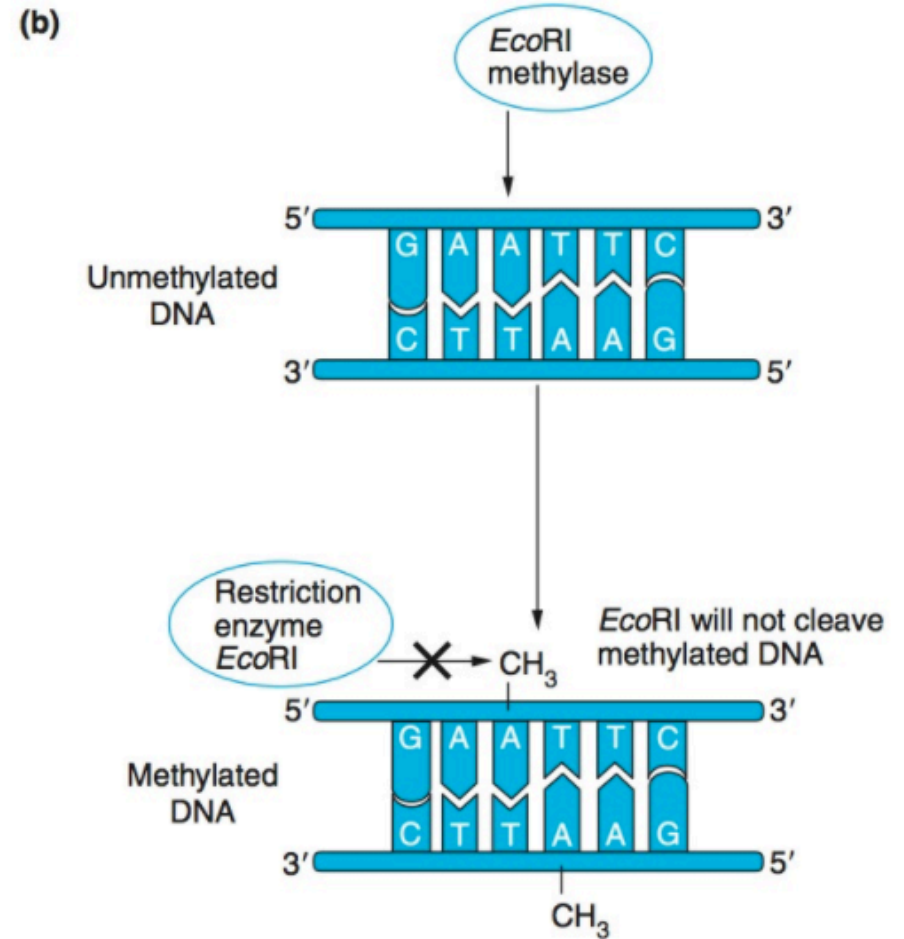
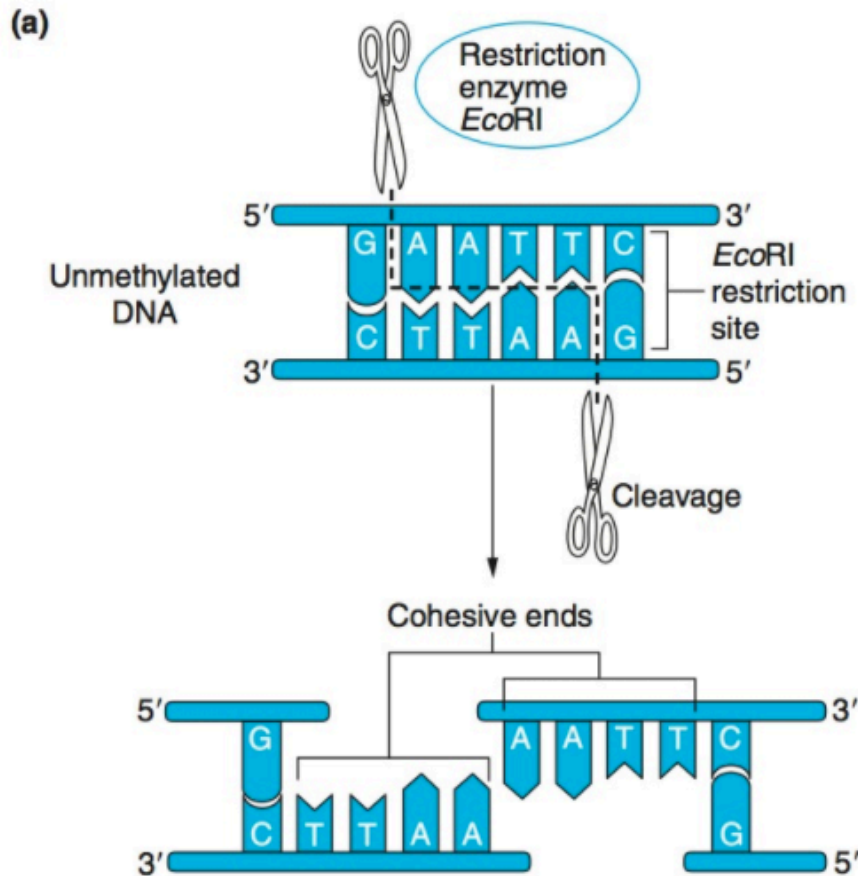


- Il DNA batterico viene protetto attraverso la metilazione delle sequenze di riconoscimento.

(b) Il DNA batterico non è tagliato



# Endonucleasi di restrizione e metiltransferasi formano il SISTEMA DI MODIFICAZIONE E RESTRIZIONE dei batteri



# Sistemi di modificazione e restrizione

sono divisi in **tre** gruppi principali in base a:

- Organizzazione in subunità dell'enzima
- Richieste di cofattori
- Sito di riconoscimento e di taglio

## Tipo I

3 subunità: R = Endonucleasi, M = Metilasi, S = Specificità di sito

- Sito di riconoscimento bipartito e asimmetrico [es. TGA(N)<sub>8</sub>TGCT]
- Non tagliano a livello del sito di riconoscimento, ma a **distanza variabile**, >1 Kb
- richiede ATP

## Tipo III

2 subunità: MS = Metilasi e Specificità di sito, R = Endonucleasi

- Riconoscono una sequenza asimmetrica di 5-7 bp
- Tagliano 25-28 bp a valle del sito di riconoscimento
- richiede ATP
- Attività di endonucleasi e metilasi sono **simultanee**

## Tipo II

- L'attività metilasi ed endonucleasica sono separate
- Riconoscono sequenze palindrome di 4-8 bp
- Tagliano all'interno delle seq riconosciute o a distanza definita
- Non richiedono ATP

Gli enzimi di **tipo I** sono poco utili perché tagliano il DNA in modo imprevedibile

Gli enzimi di **tipo III** sono difficilmente controllabili perché tagliano e metilano il DNA contemporaneamente

Gli enzimi di restrizione di **tipo II** invece tagliano il DNA in modo specifico, e riproducibile.

# Nomenclatura degli enzimi di restrizione

1. Le prime tre lettere, scritte in corsivo, sono prese dalla nomenclatura del batterio di origine.
2. Tipi differenti dello stesso organismo sono identificati da una quarta lettera minuscola (Es. *Hind*, *Hinf*).
3. Segue una lettera maiuscola o un numero, che identificano un ceppo particolare di quel batterio, ove fosse necessario.
4. Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi.

## **Enzima** **batterio di origine**

***Eco* RI**    *Escherichia coli* RY13

***Sau* 3A**    *Staphylococcus aureus* ceppo 3A

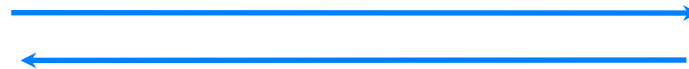
***Hinf* I**    *Haemophilus influenzae* (sierotipo Rf)

***Hind* III**    *Haemophilus influenzae* (sierotipo Rd)

# I siti di restrizione degli enzimi tipo II sono generalmente palindromi

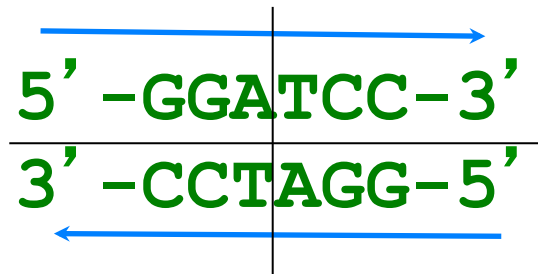
- 4-8 basi in genere palindroma

“I TOPI NON AVEVANO NIPOTI”  
“O MORDO TUA NUORA O ARO UN AUTODROMO”



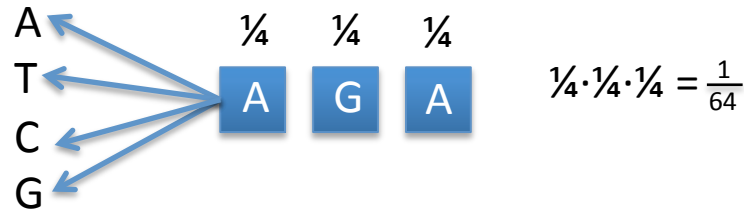
Una palindrome è una sequenza con un DOPPIO asse di simmetria:

BamHI site:



## Quante volte taglia un enzima di restrizione?

La maggior parte riconosce palindromi di 4 o 6 nucleotidi;  
Se assumiamo che i nucleotidi siano distribuiti a caso nelle  
molecole di DNA:



-per enzimi che riconoscono palindromi di 4 nt si avrà **IN MEDIA**  
un taglio ogni 256 nucleotidi ( $4^4$ ).

-per enzimi che riconoscono palindromi di n nucleotidi avremo **IN MEDIA**  
un taglio ogni  $4^n$  nucleotidi [se  $n=6$  il taglio sarà i media  
ogni 4.096 nucleotidi ( $4^6$ )].

# Classificazione delle ER in base alle estremità che possono essere generate

## Eco RI

-GAATTC-  
-CTTAAG-

-G<sup>3'</sup>                      5' AATTC-  
-CTTAA<sup>5'</sup>                      3' G-

**5' protruding**

## Eco RV

-GATATC-  
-CTATAG-

-GAT<sup>3'</sup>                      5' ATC-  
-CTA<sup>5'</sup>                      3' TAG-

**blunt**

## Pst I

-CTGCAG-  
-GACGTC-

-CTGCA<sup>3'</sup>                      5' G-  
-G<sup>5'</sup>                      3' ACGTC-

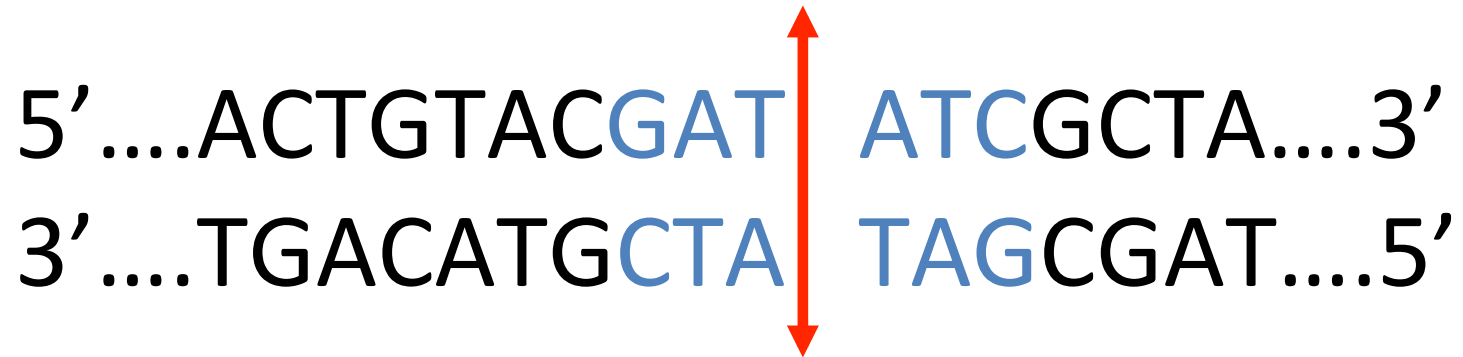
**3' protruding**



# *EcoRV*


5' ....ACTGTACGATATCGCTA....3'  
3' ....TGACATGCTATAGCGAT....5'

# *EcoRV*



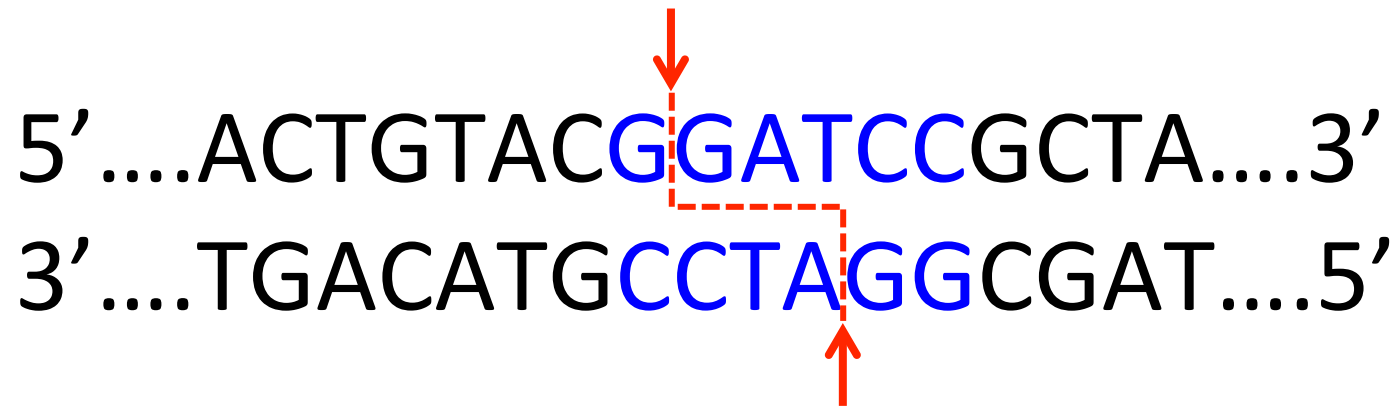
# *EcoRV*

5'...ACTGTACGAT ATCGCTA...3'  
3'...TGACATGCTA TAGCGAT...5'



“blunt ends”

# *Bam*HI



# *Bam*HI

5'....ACTGTACG GATCCGCTA....3'  
3'....TGACATGCCTAG GCGAT....5'

# *Bam*HI

5' ....ACTGTAC**G**  
3' ....TGACATG**CCTAG**

GATCCGCTA....3'  
GCGAT....5'

“sticky ends”



**TABLE 4-1. Some restriction enzymes and their cleavage sequences**

Microorganism	Enzyme abbreviation	Sequence	Notes
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	5' ...G G C C...3' 3' ...C C G G...5'	1
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	5' ...T C G A...3' 3' ...A G C T...5'	2
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	HhaI	5' ...G C G C...3' 3' ...C G C G...5'	3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI	5' ...C T N A G...3' 3' ...G A N T C...5'	4
<i>Moraxella bovis</i>	MboII	5' ...G A A G A (N) <sub>8</sub>  ...3' 3' ...C T T C T (N) <sub>7</sub>  ...5'	5
<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' ...G A T A T C...3' 3' ...C T A T A G...5'	1
	EcoRI	5' ...G A A T T C...3' 3' ...C T T A A G...5'	2
<i>Providencia stuarti</i>	PstI	5' ...C T G C A G...3' 3' ...G A C G T C...5'	3
<i>Microcoleus</i>	MstII	5' ...C C T N A G G...3' 3' ...G G A N T C C...5'	4
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	NotI	5' ...G C G G C C G C...3' 3' ...C G C C G G C G...5'	6

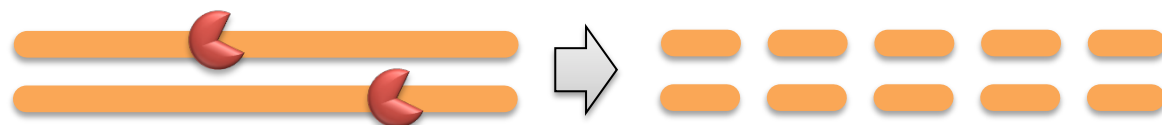
CTAAG  
CTTAG  
CTCAG  
CTGAG

Sequenze di riconoscimento degenerate

**Notes**

1. Enzyme produces blunt ends.
2. The single strand is the 5' strand.
3. The single strand is the 3' strand.
4. The base pair *N* can be any purine or pyrimidine pair.
5. The enzyme does not cut within the recognition sequence, but at whatever sequence lies eight nucleotides 3' to the recognition site.
6. NotI has an eight-base recognition sequence and cuts mammalian DNA very infrequently.

# Esempi di dimensione media di frammenti tagliati attraverso enzimi di restrizione



Enzima	Sito di riconoscimento	Frequenza media tagli	Dimensione media frammenti
HaeIII	GGCC	$1/4^4$	$4^4 = 256$ bp
EcoRV	GATATC	$1/4^6$	$4^6 = 4096$ bp
NotI	GCGGCCGC	$1/4^8$	$4^8 = 65536$ bp
DdeI	CTNAG	$1/4^4$	$4^4 = 256$ bp
BtgI	CCRYGG	$1/(4^4 \cdot 2^2)$	$4^4 \cdot 2^2 = 1024$ bp

N = A, T, C, G

Y = T, C

R = A, G



# REBASE

Database aggiornato mensilmente, contiene i dati su tutti gli enzimi di restrizione conosciuti:

- oltre 3500 endonucleasi di restrizione
- oltre 500 enzimi di tipo II disponibili

## REBASE Statistics 03/20/2016

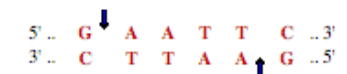


Enzymes :	References :	Crystals :
Total: 122978	Total: 18622	Restriction Enzymes 52
Restriction Enzymes 4220	Published: 13201	Type I 3
Type I 112	Patents: 1082	Type II 47
Type II 4067	Unpublished: 4337	Type III 1
Type III 22	Pending: 0	Type IV 1
Type IV 19		Weirdo REs 1
Weirdo REs 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#">Patents linked to Biochemically-characterized enzymes (824)...</a></li> <li>• <a href="#">REBASE journals (order by journal name)...</a></li> <li>• <a href="#">REBASE journals (order by ref count)...</a></li> </ul>	Putative REs 2
Putative REs 39478		Methyltransferases 22
Methyltransferases 2564	<p><a href="#">Enzymes isolated at NEB: 1559 (476 specificities)</a></p> <p><a href="#">How many enzymes have been entered per year...</a></p> <p><a href="#">Enzymes by year showing subunit counts...</a></p> <p><a href="#">Classes of Type II restriction enzyme recognition sequences...</a></p>	Type I 2
Type I 491		Type II 8
Type II 1699		Type III 0
Type III 167		Orphan Methylases 12
Orphan Methylases 207		Weirdo Methylases 0
Weirdo Methylases 0		Putative Methylases 7
Putative Methylases 65933		Specificity Subunits 1
Specificity Subunits 490		Type I 1
Type I 479		Type II 0
Type II 11		Type III 0
Type III 0		Putative Specif. Subunits 3
Putative Specif. Subunits 13708		Other Kinds of Enzymes:
Other Kinds of Enzymes:	Distinct Specificities:	Homing Endonucleases 21
Homing Endonucleases 107	prototypes total	Nicking Enzymes 3
Nicking Enzymes 35	Type II REs 389 390	Control Proteins 4
Control Proteins 17	Type I REs 47 112	Helicase Domain Proteins 3
Helicase Domain Proteins 3	Methyl-Specific REs 18 69	
Putatives 115734	Type III REs 13 22	
Type I RE 10883	Homing Endos 87 107	
Type II RE 16958	Type II Methylases 362 1699	
Type III RE 4274	Orphan Methylases 24 207	
Orphan Methylases 3270	Type IV 3 19	
Type I Methylases 12021	Commercial Availability:	
Type II Methylases 45910	Restriction Enzymes: 624	
Type III Methylases 4732	Methyltransferases: 36	
Type IV 7370	Homing Endonucleases: 5	
Homing Endonucleases 29	Nicking Enzymes: 13	
Nicking Enzymes 2816	Distinct Type II RE specificities: 237	
Control Proteins 753		
Specificity Subunits 13708		
Helicase Domain Proteins 46		

## EcoRI

Type II restriction enzyme subtype: P

Recognition Sequence: [help?](#)  
G<sup>A</sup>AATTC

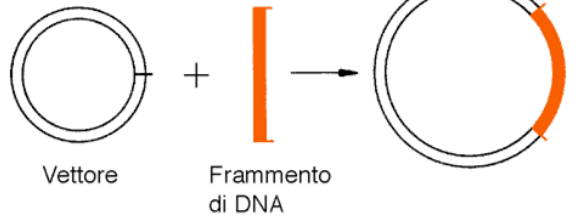


REBASE Enz Num 993 [enter](#)

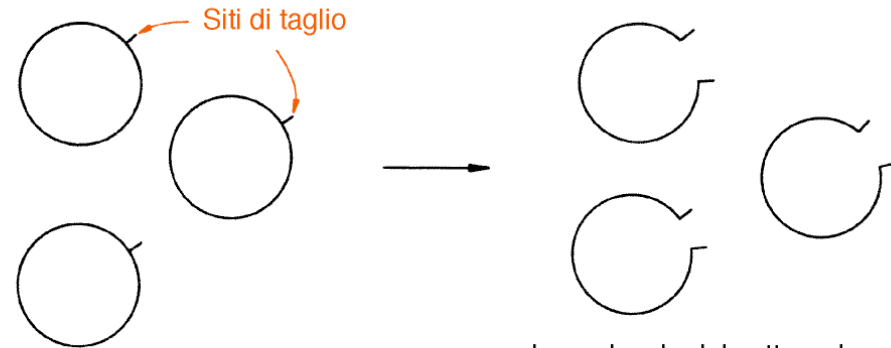
Acronym: [EcoR](#)  
 Prototype: EcoRI  
 Org #: [1394](#)  
 Organism: [Escherichia coli RY13](#)  
 Organism type: [plasmid](#)  
 Organism source: [R.N. Yoshimori](#)  
 Growth Temperature: 37 °  
 Experimental Evidence: [biochemist](#)  
 Exhibits star activity  
 Single-stranded cleavage: y  
 Enzyme gene cloned  
 Enzyme gene sequenced  
 Crystal data present  
[Kinetics data present](#)  
 Molecular Weight: 31057

# Importanza della specificità di taglio nel clonaggio genico

## 1 Costruzione di una molecola di DNA ricombinante

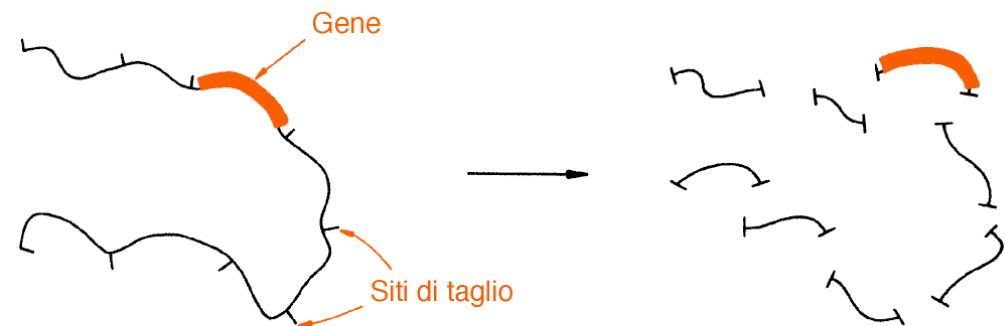


## (a) Molecole del vettore



Le molecole del vettore devono essere tagliate una volta, tutte nella stessa posizione

## (b) La molecola di DNA che contiene il gene da clonare



Grossa molecola di DNA

Frammenti abbastanza piccoli da poter essere clonati

# Estremità compatibili

Vettore

5' ...ACTGTACG GATCCGCTA...3'  
3' ...TGACATGCCTAG GCGAT...5'

*BamHI*

*5' sporgenti*

Inserto

5' GATCCGGCA.....CCTGAAAG 3'  
3' GCCGT.....GGACTTTCCTAG 5'



ACTGTACG GATCCGGCA.....CCTGAAAG GATCCGCTA  
TGACATGCCTAG GCCGT.....GGACTTTCCTAG GCGAT



ACTGTACGGATCCGGCA.....CCTGAAAGGATCCGCTA  
TGACATGCCTAGGCCGT.....GGACTTTCCTAGGCGAT



# Estremità compatibili

## Vettore

BamHI

5' ...ACTGTACG GATCCGCTA...3'  
3' ...TGACATGCCTAG GCGAT...5'

## Inserto

BglII

5' GATCTGCTA...ACTGTACA3'  
3' ACGAT...TGACATGTCTAG5'



5' ...ACTGTACGGATCTGCTA...3'  
3' ...TGACATGCCTAGACGAT...5'

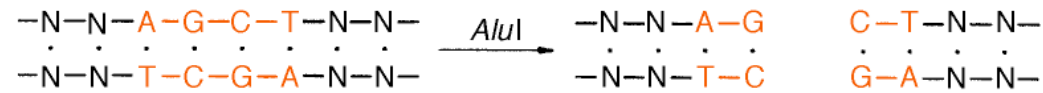
**Isocaudameri:** enzimi che riconoscono siti diversi ma lasciano estremità compatibili.

Per il clonaggio quello che interessa sono **le estremità** non il sito di restrizione.

**NB: Non sempre** quando si uniscono i due frammenti **si riforma il sito** riconosciuto dai due enzimi!

# Estremità compatibili

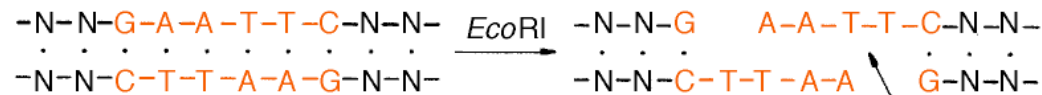
## (a) Produzione di estremità nette



'N' = A, G, C o T

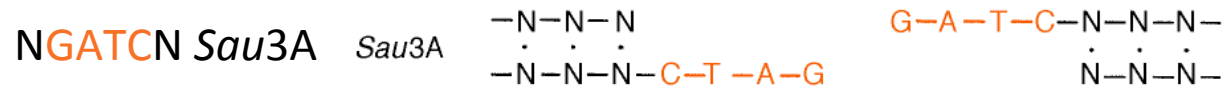
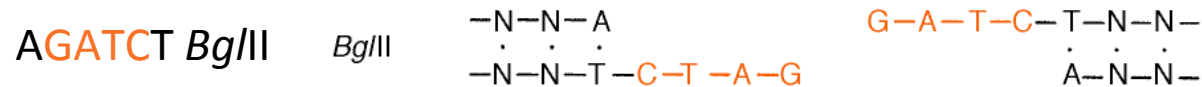
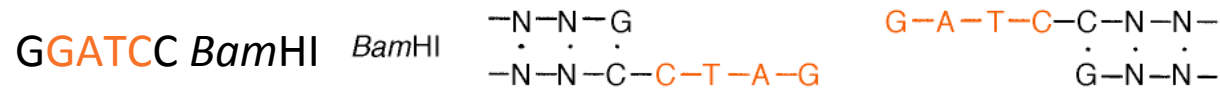
Estremità nette

## (b) Produzione di estremità coesive



Estremità coesive

## (c) Estremità coesive uguali prodotte da endonucleasi di restrizione diverse



Isocaudameri

# Isoschizomeri - Neoschizomeri

- Enzimi di restrizione differenti che riconoscono la stessa sequenza e la tagliano allo stesso modo si definiscono **isoschizomeri**
- Stesso sito riconosciuto: es. *BfuCI*, *Sau3A*, *MboI*, *NdeI* riconoscono tutti la seq /GATC

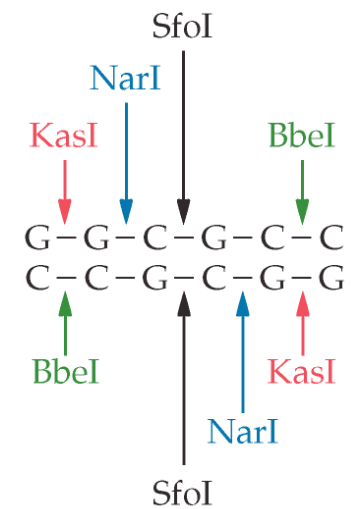
Enzyme	Sequence	Overhang
<i>BfuCI</i>	↓GATC↑	5' GATC

→

<i>MboI</i>	↓GATC↑	5' GATC
<i>NdeI</i>	↓GATC↑	5' GATC
<i>Sau3AI</i>	↓GATC↑	5' GATC

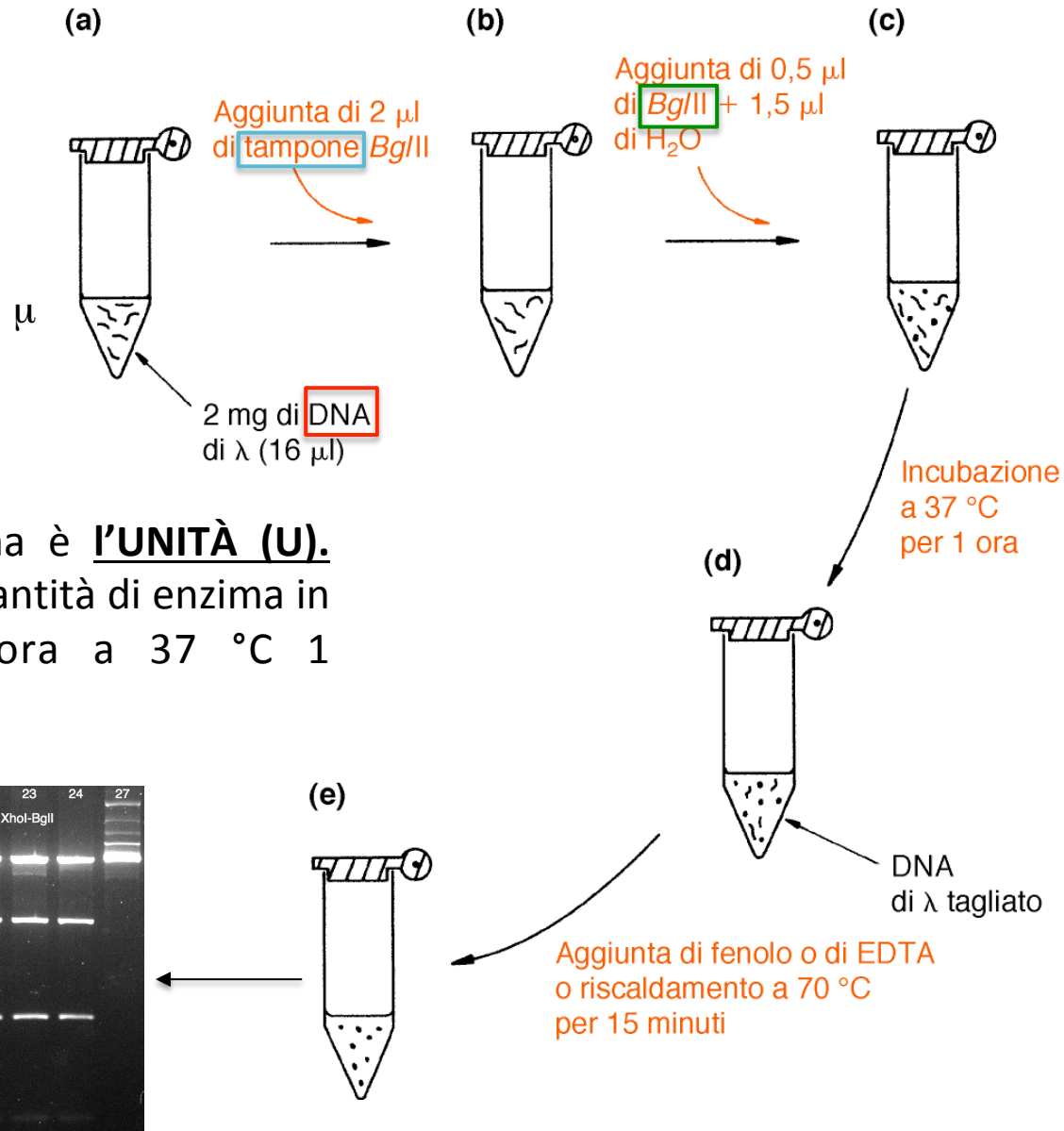
- Esistono però anche enzimi (neoschizomeri) che riconoscono lo stesso sito ma fanno un taglio diverso tra di loro:

Enzyme	Sequence	Cut Site	Overhang
<i>KasI</i>	GGCGCC	G/G C G C C C C G C G/G	5' - GCGC
<i>NarI</i>	GGCGCC	G G /C G C C C C G C /G G	5' - CG
<i>SfoI</i>	GGCGCC	G G C /G C C C C G /C G G	blunt
<i>BbeI</i>	GGCGCC	G G C G C /C C /C G C G G	GCGC- 3'

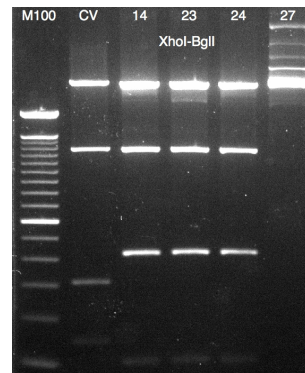


# Reazione di restrizione

Enzyme Info							
Name:	HindIII						
Overhang:	5'-AGCT						
Recognition Sequence:	AAGCTT						
	<pre> - AAGCTT - - TTCGAA -           </pre>						
Incubation Temperature:	37°C						
Supplied Buffer:	E						
Minimum % Activity in Promega Buffers:							
	A	B	C	D	E	H	MultiCore
HindIII	25	100	75	10	100	25	50



L'unità di misura dell'enzima è **l'UNITÀ (U)**.  
 Una U, è definita come la quantità di enzima in grado di digerire in 1 ora a 37 °C 1 microgrammo di DNA di  $\lambda$ .





This tool will take a DNA sequence and find the large, non-overlapping open reading frames using the E.coli genetic code and the sites for all Type II and commercially available Type III restriction enzymes that cut the sequence just once. By default, only enzymes available from NEB are used, but other sets may be chosen. Just enter your sequence and "submit". Further options will appear with the output. **The maximum size of the input file is 1 MByte, and the maximum sequence length is 300 Kbases.**

[What's new in V2.0](#) [Citing NEBcutter](#)

Local sequence file:  Nessun file selezionato.

GenBank number:  [Browse GenBank](#)

or paste in your DNA sequence: *(plain or FASTA format)*

Submit

Standard sequences: # Plasmid vectors  # Viral + phage

NEB enzymes  
 All commercially available specificities  
 All specificities  
 All + defined oligonucleotide sequences  
 Only defined oligonucleotide sequences  
[define oligos](#)

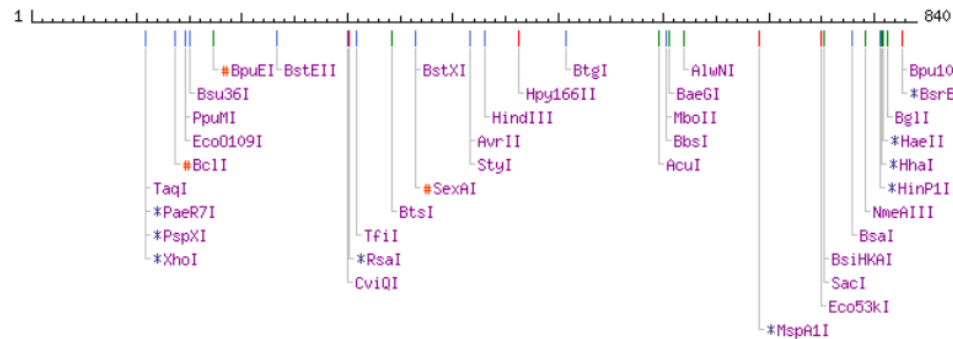
The sequence is:  Linear  Circular

Enzymes to use:

Minimum ORF length to display:  a.a.

Name of sequence:  *(optional)*

More options Set colors



Cleavage code	Enzyme name code
▲   blunt end cut	Available from NEB
▲   5' extension	Has other supplier
▲   3' extension	Not commercially available
▲   cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	#: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site

<b>Main options</b> <a href="#">New DNA</a> <a href="#">Custom digest</a> <a href="#">View sequence</a> <a href="#">ORF summary</a> <a href="#">Save project</a> <a href="#">Print</a>	<b>Availability</b> <a href="#">All commercial</a> <a href="#">All</a>	<b>Display</b> <a href="#">2 cutters</a> <a href="#">3 cutters</a>	<b>Zoom</b> <a href="#">Zoom in</a> <a href="#">More...</a>	<b>List</b> <a href="#">0 cutters</a> <a href="#">1 cutters</a> <a href="#">All sites</a> <a href="#">Save all sites</a> <a href="#">Flanking enzymes</a>
--	--	--	---	--

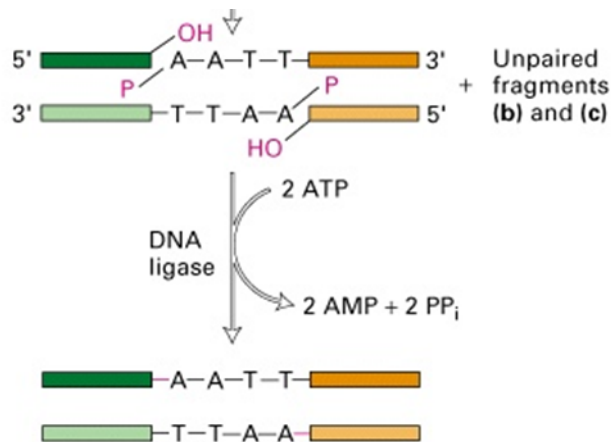
Minimum ORF length to display:  aa.

# Enzimi per la manipolazione del DNA

- **Nucleasi:** tagliano, accorciano o degradano molecole di acidi nucleici
- **Polimerasi:** producono copie di molecole di acidi nucleici
- **Enzimi di modificazione:** rimuovono o aggiungono gruppi chimici
- **Ligasi:** uniscono molecole di acidi nucleici
- **Topoisomerasi:** sono capaci di cambiare la conformazione di DNA circolari chiusi covalentemente

# Ligasi

Enzima in grado di riformare il legame fosfodiesterico nella molecola di DNA



**La reazione necessita di ATP**

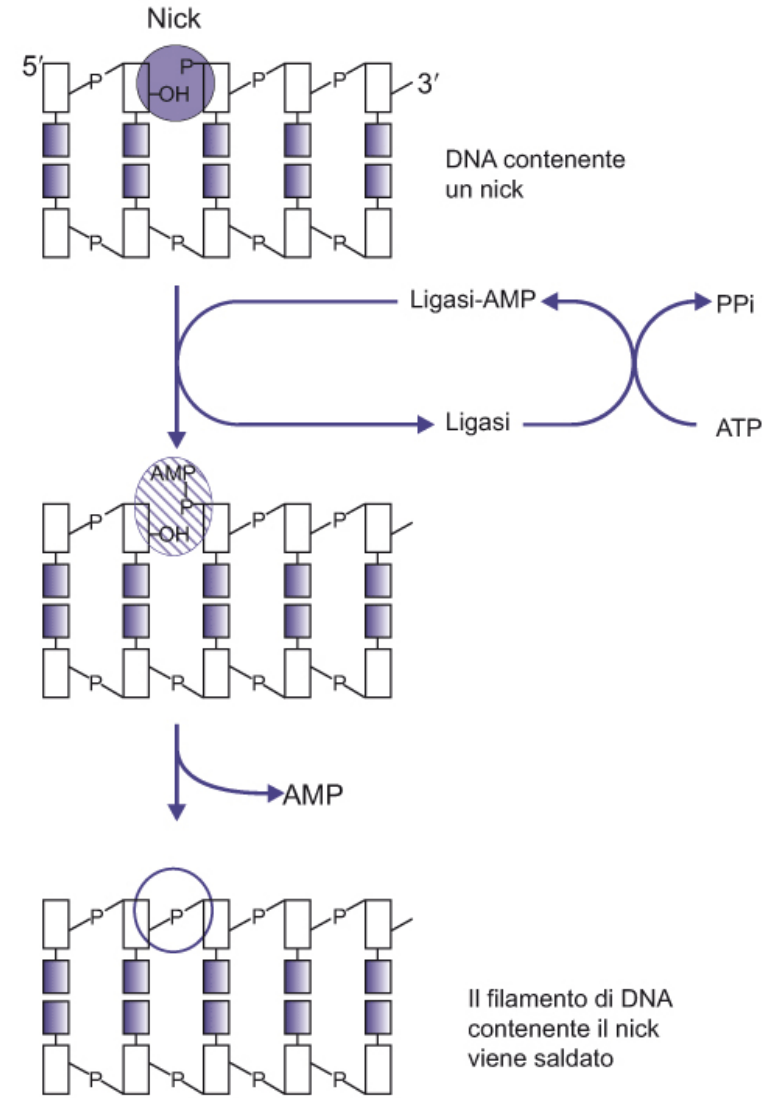
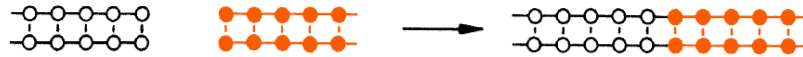


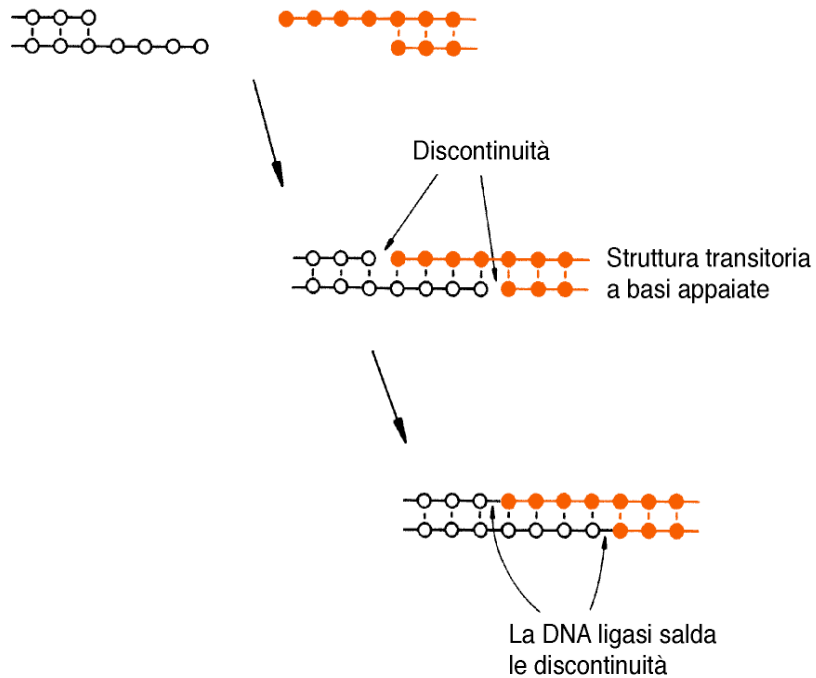
Figura 2.13 Attività della T4 DNA ligasi.

# Ligazione

(a) Legatura di estremità nette → Più difficile



(b) Legatura di estremità coesive → Più facile

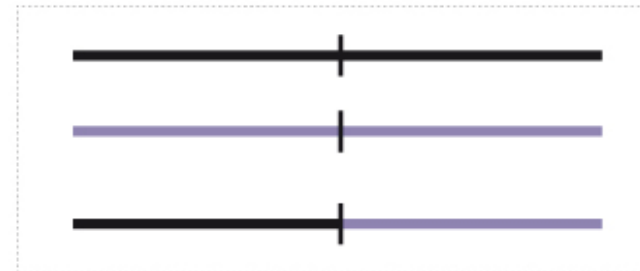


Vettore

Inserto



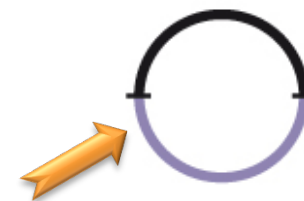
Monomeri circolari



Dimeri lineari (o multimeri)



Dimeri circolari



Plasmide ricombinante

# Prevenire la ligazione indesiderata → 1) Fosfatasi alcalina

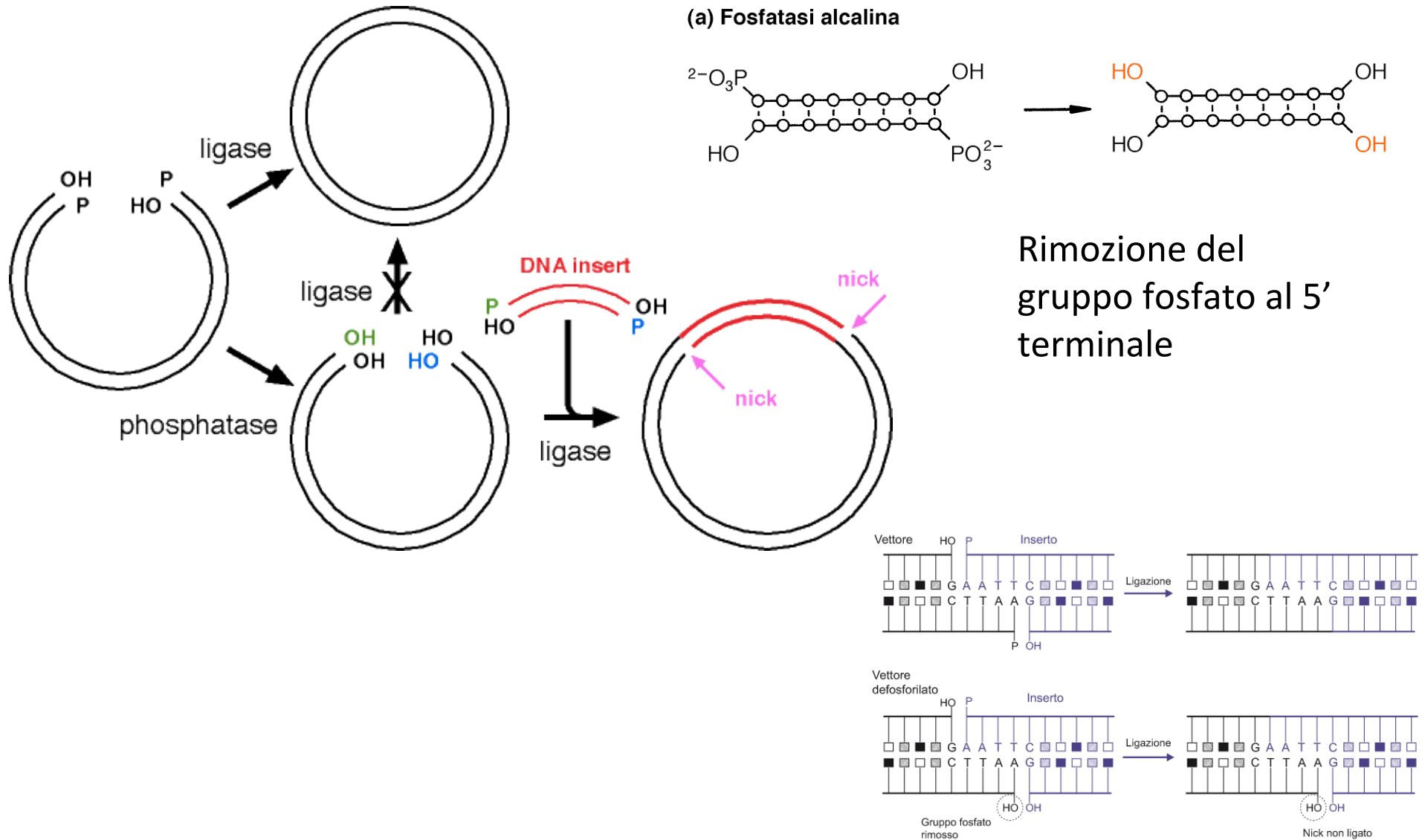
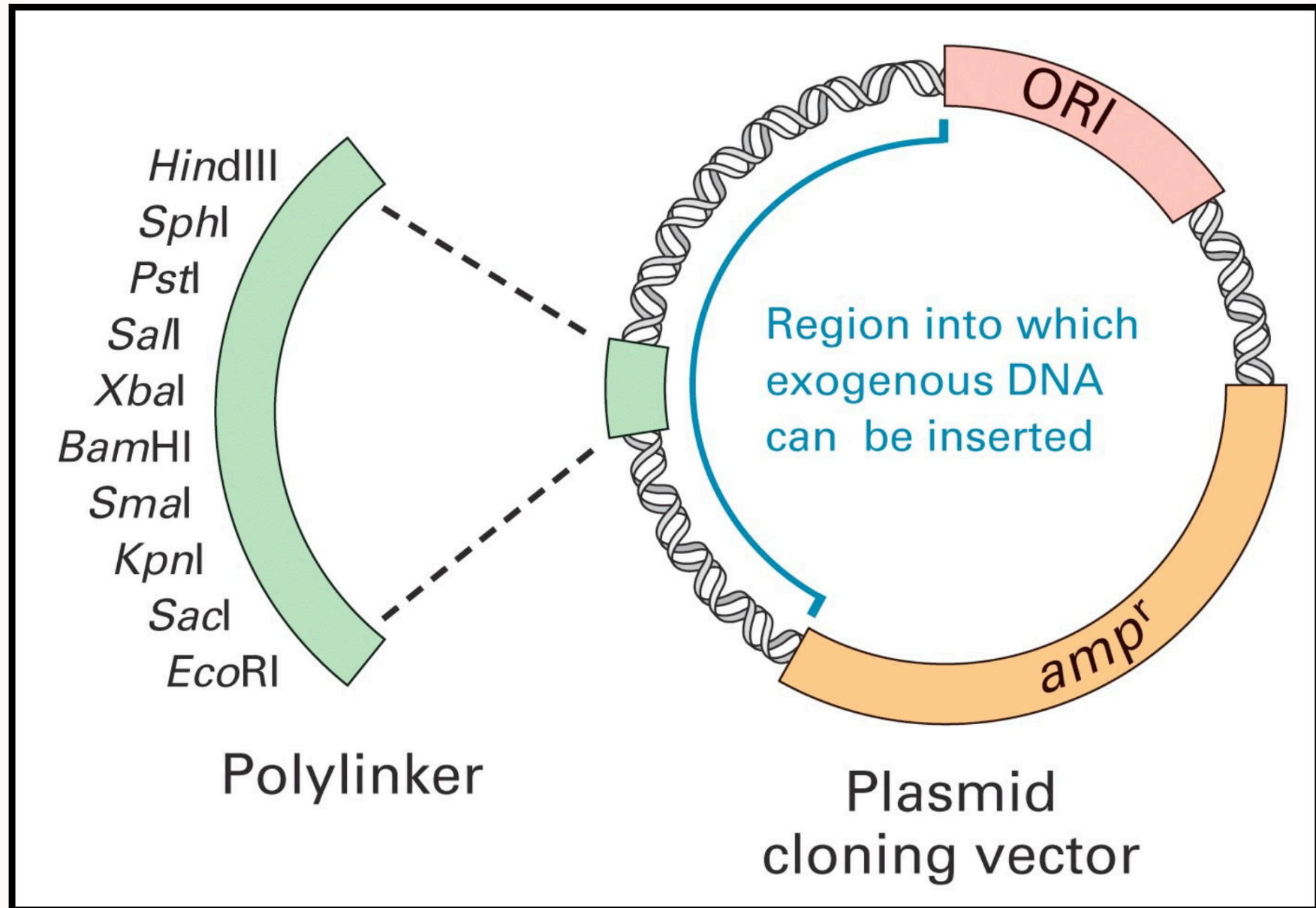
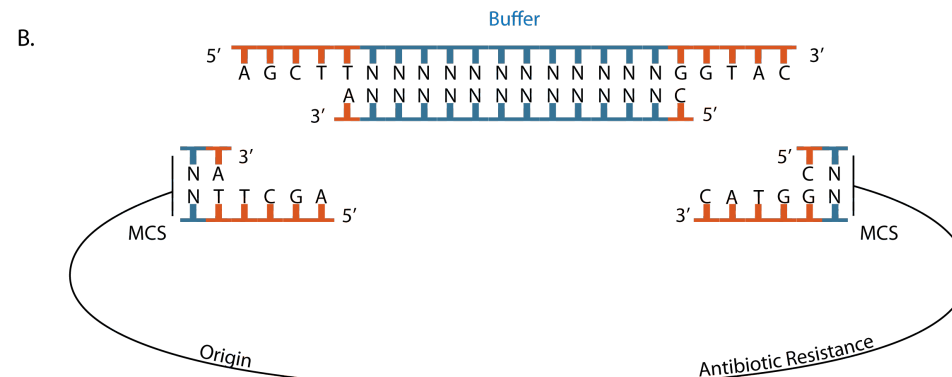
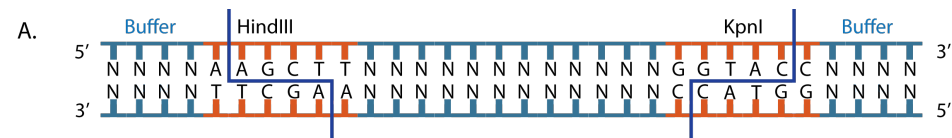
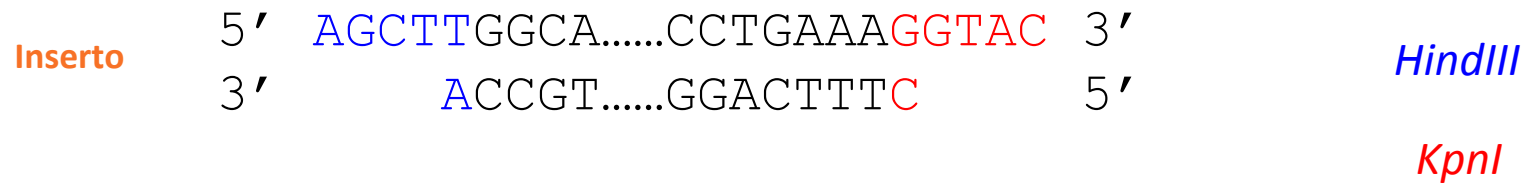


Figura 2.15 Ligazione: effetto della defosforilazione del vettore.

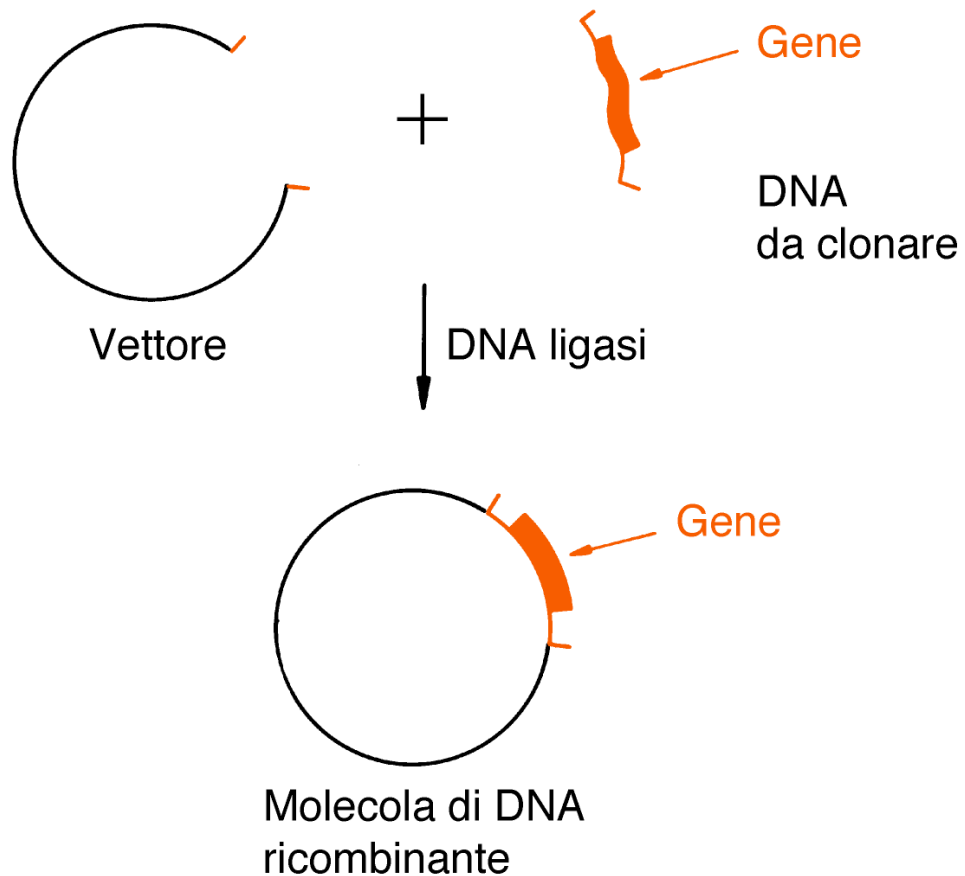
Prevenire la ligazione indesiderata → 2) doppia digestione



## Prevenire la ligazione indesiderata → 2) doppia digestione



# Modifica delle estremità dei frammenti di restrizione



- Non sempre le estremità di inserto e vettore sono fra loro compatibili;
- d'altro canto in un esperimento di clonaggio è auspicabile legare insieme molecole di DNA che possiedono estremità coesive.

- Blunt to Sticky
- Sticky to Blunt



# Modifica delle estremità: 1 - linker

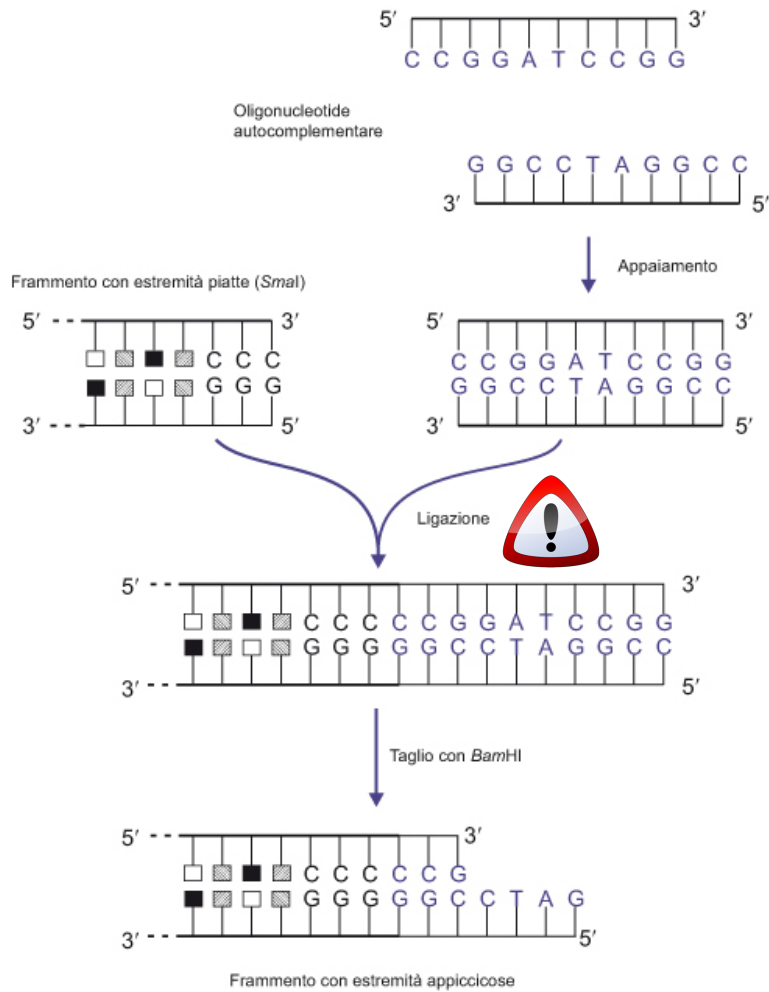
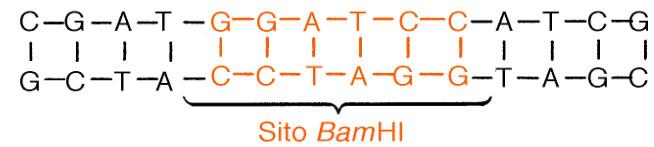
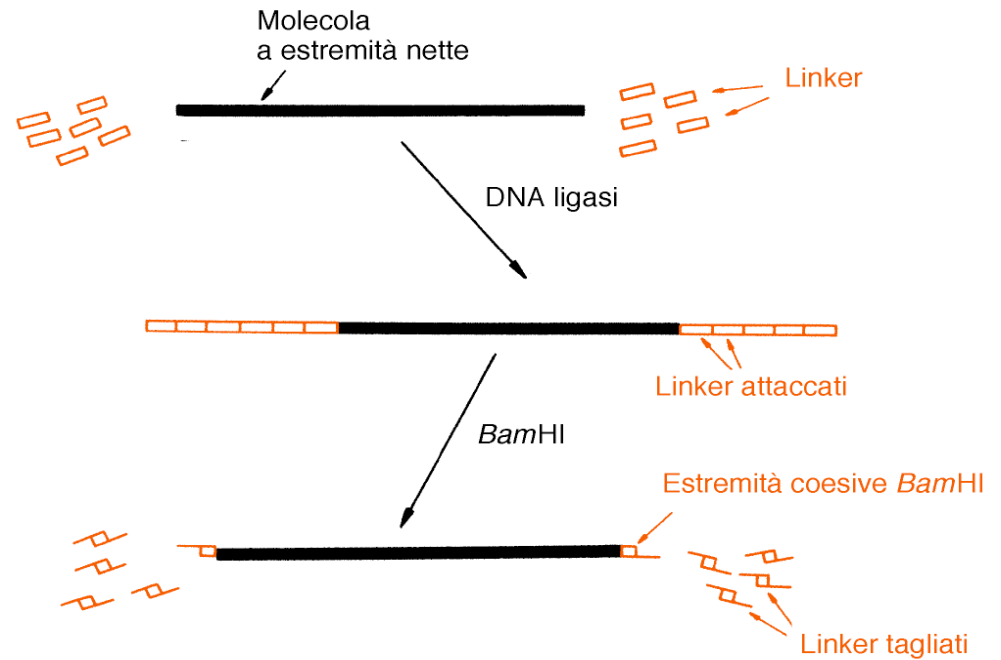


Figura 2.17 Linker.

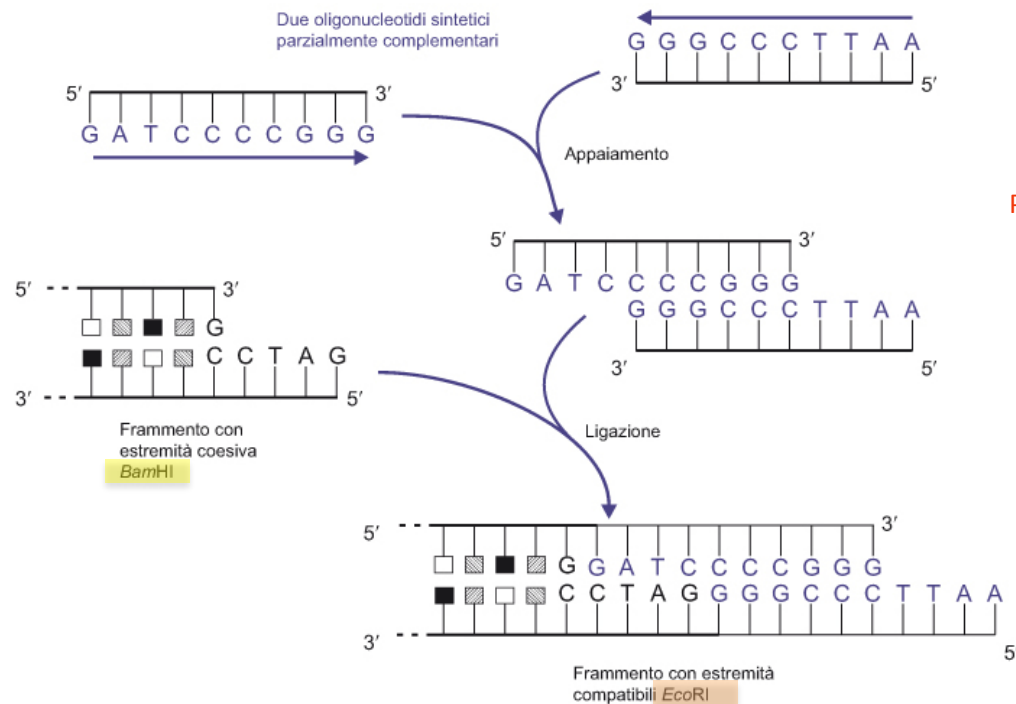
## (a) Un tipico linker



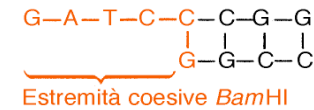
## (b) L'uso dei linker



# Modifica delle estremità: 2 - adattatori



(a) Un tipico adattatore



Problema:

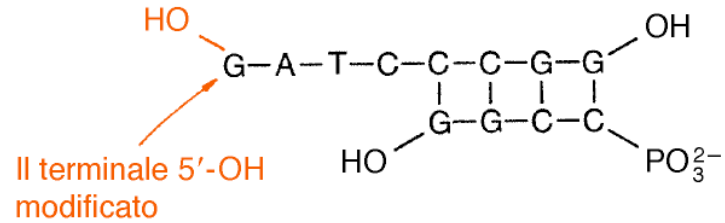
Figura 2.18 Adattatori.

# Risoluzione del problema

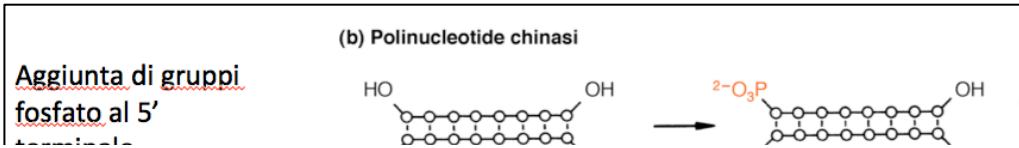
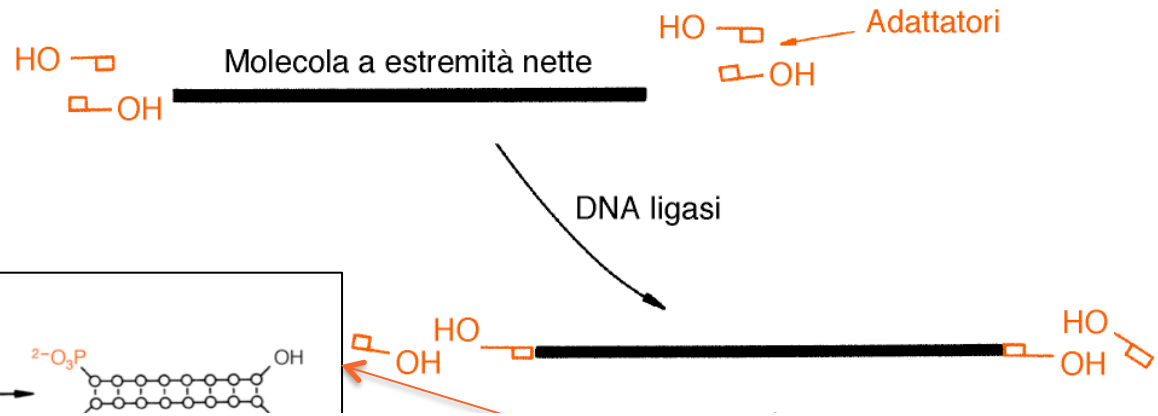
Un adattatore viene sintetizzato in modo che l'estremità piatta sia in grado di essere ligata

Quella coesiva ha invece il 5' privo del gruppo fosfato (è un 5'-OH)

(a) La struttura precisa di un adattatore

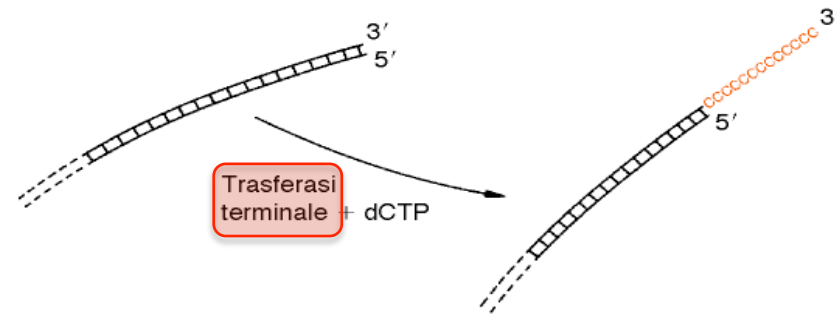


(b) Legatura con adattatori

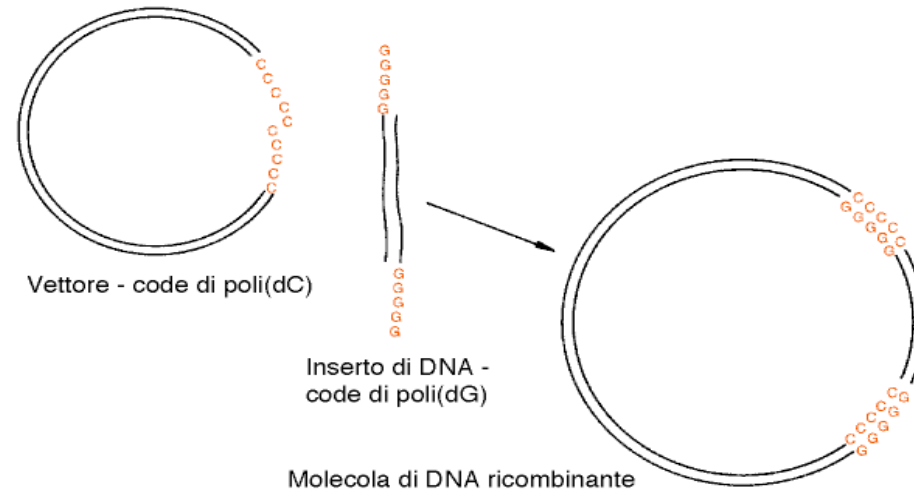


# Modifica delle estremità: 3 – uso di code omopolimeriche

(a) Sintesi di una coda omopolimerica

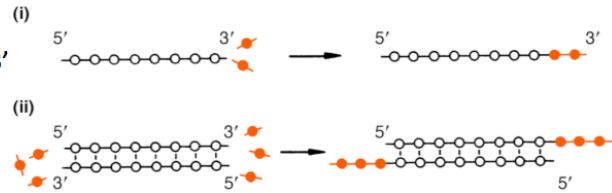


(b) Legatura di code omopolimeriche



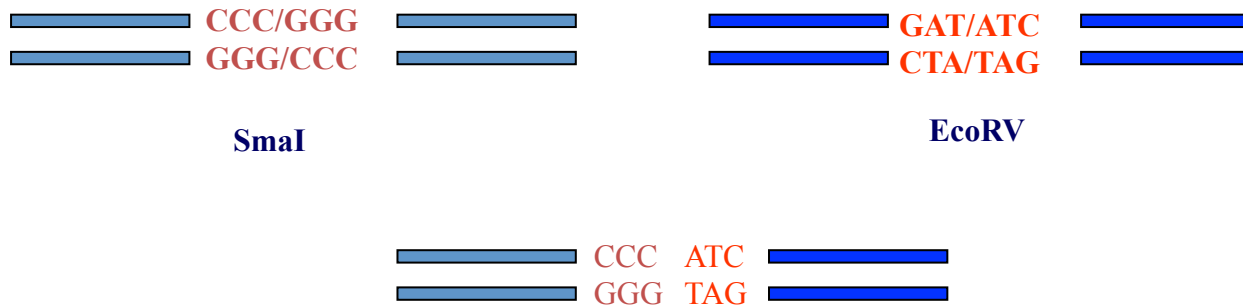
(c) Deossinucleotidil trasferasi terminale

Aggiunta di nucleotidi al 3' terminale



# Ligazione di estremità piatte

Estremità blunt possono essere legate a estremità blunt prodotte da qualsiasi altro enzima.



## PRO

- No limitazioni della complementarità delle basi delle estremità sporgenti.

## CONTRO

- Ligazione meno efficiente perché non si ha appaiamento tra estremità coesive complementari e la ligasi deve attendere che associazioni casuali avvicinino le due estremità.



Il giusto equilibrio delle concentrazioni delle molecole di DNA da legare può favorire l'appaiamento in modo corretto.

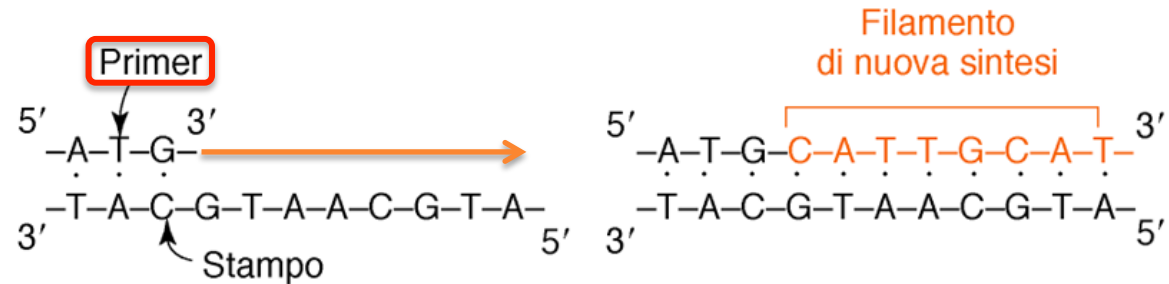
# Polimerasi

Le DNA polimerasi sintetizzano un nuovo filamento di DNA complementare ad uno stampo di DNA

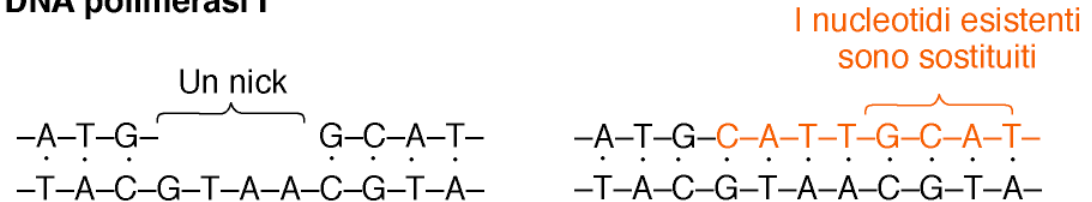
**DNA pol I** (da E.coli) si lega ad una regione a singolo filamento, sintetizza un filamento nuovo e degrada il filamento esistente.

La rimozione del dominio di DNA pol I che contiene attività nucleasica, produce un enzima modificato, **frammento di Klenow**, che riempie i nick.

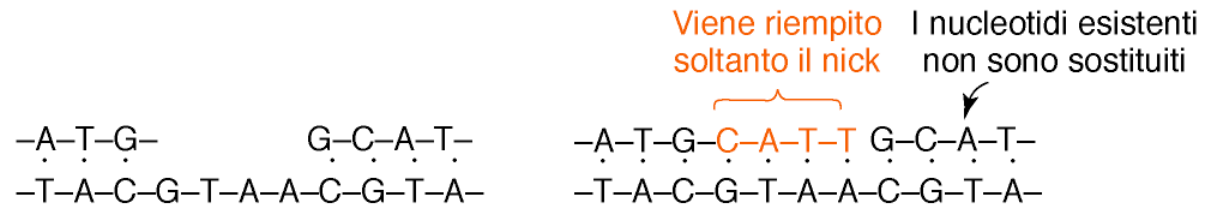
(a) La reazione di base



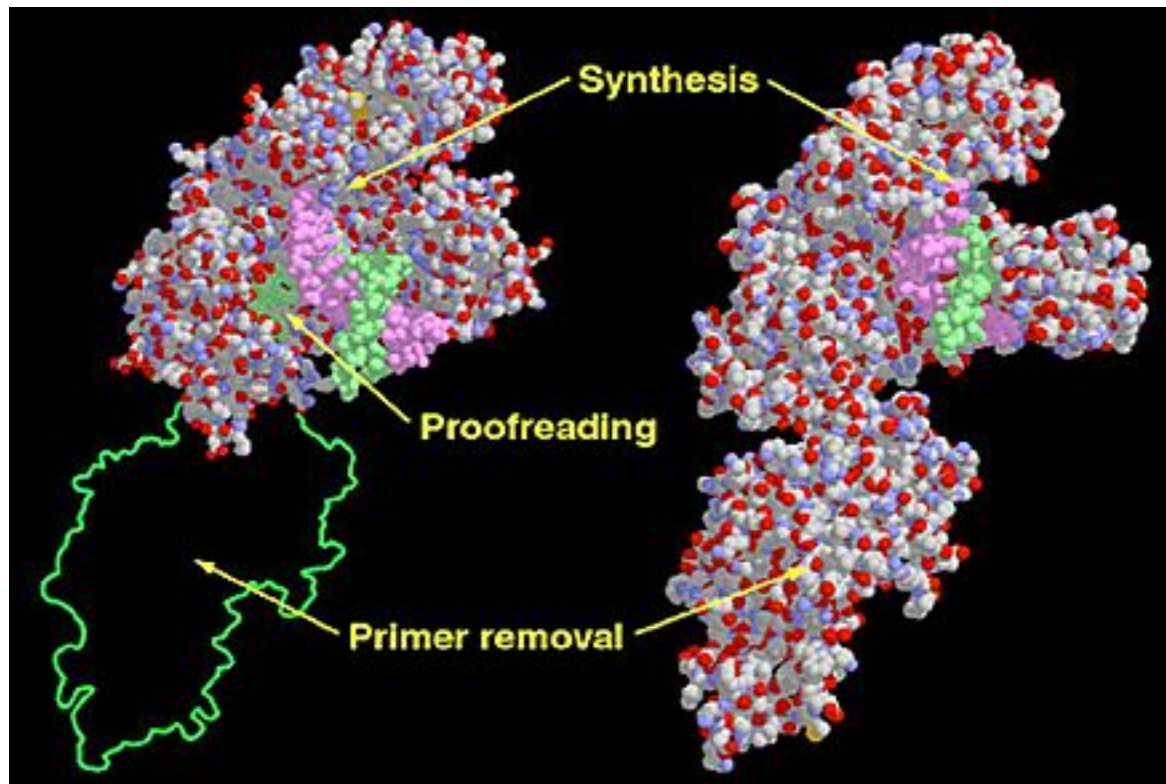
(b) DNA polimerasi I



(c) Il frammento di Klenow

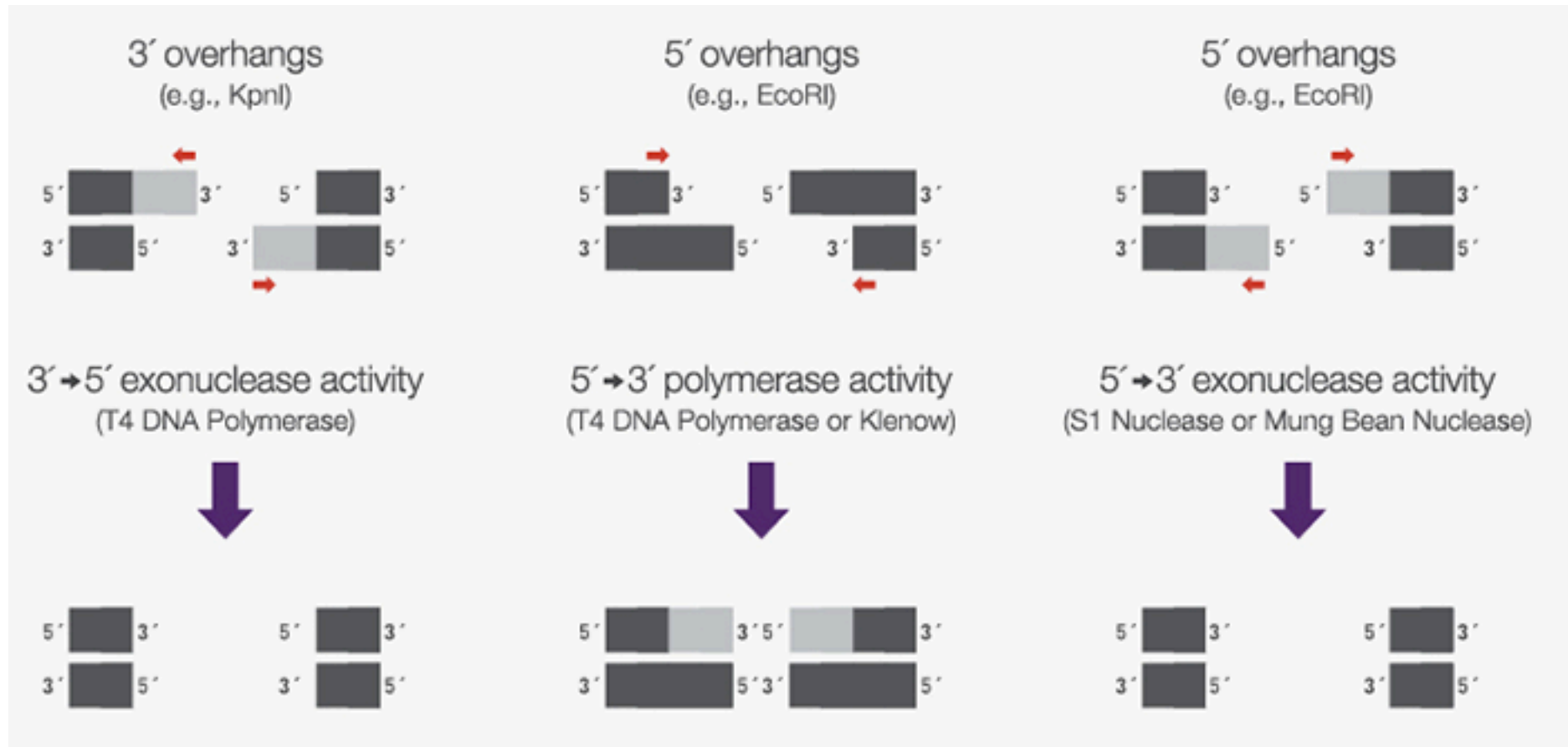


# Frammento di Klenow



Domini funzionali del frammento di Klenow (sinistra) e DNA Polimerasi I (PDB).

# Modifica delle estremità: 4 – uso di DNA polimerasi





# Vettori diversi hanno capacità diverse

La scelta del vettore e del sistema di clonaggio è determinata dalle dimensioni dell'inserto da clonare e dall'applicazione.

**TABLE 2 A COMPARISON OF DNA VECTORS AND THEIR APPLICATIONS**

Vector Type	Maximum Insert Size (kb)	Applications	Limitations
Bacterial plasmid vectors (circular)	~ 6-12	DNA cloning, protein expression, subcloning, direct sequencing of insert DNA	Restricted insert size; limited expression of proteins; copy number problems; replication restricted to bacteria
Bacteriophage vectors (linear)	~ 25	cDNA, genomic and expression libraries	Packaging limits DNA insert size; host replication problems
Cosmid (circular)	~ 35	cDNA and genomic libraries, cloning large DNA fragments	Phage packaging restrictions; not ideal for protein expression; cannot be replicated in mammalian cells
Bacterial artificial chromosome (BAC, circular)	~ 300	Genomic libraries, cloning large DNA fragments	Replication restricted to bacteria; cannot be used for protein expression
Yeast artificial chromosome (YAC, circular)	200-2,000	Genomic libraries, cloning large DNA fragments	Must be grown in yeast; cannot be used in bacteria
Ti vector (circular)	Varies depending on type of Ti vector used	Gene transfer in plants	Limited to use in plant cells only; number of restriction sites randomly distributed; large size of vector not easily manipulated

Un vettore deve possedere:

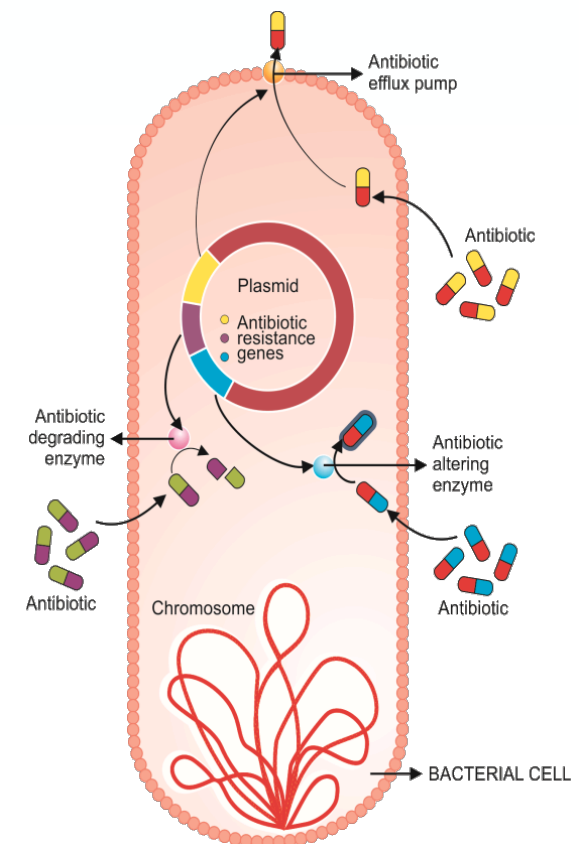
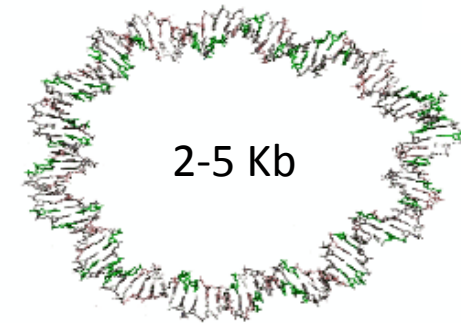
- **origine di replicazione (ori)**: consente la replicazione in una cellula ospite

- **siti di taglio unici** → **siti di clonaggio**, dimensioni

- uno o più **marcatori selezionabili** permette di selezionare le cellule che ospitano la molecola di DNA ricombinante

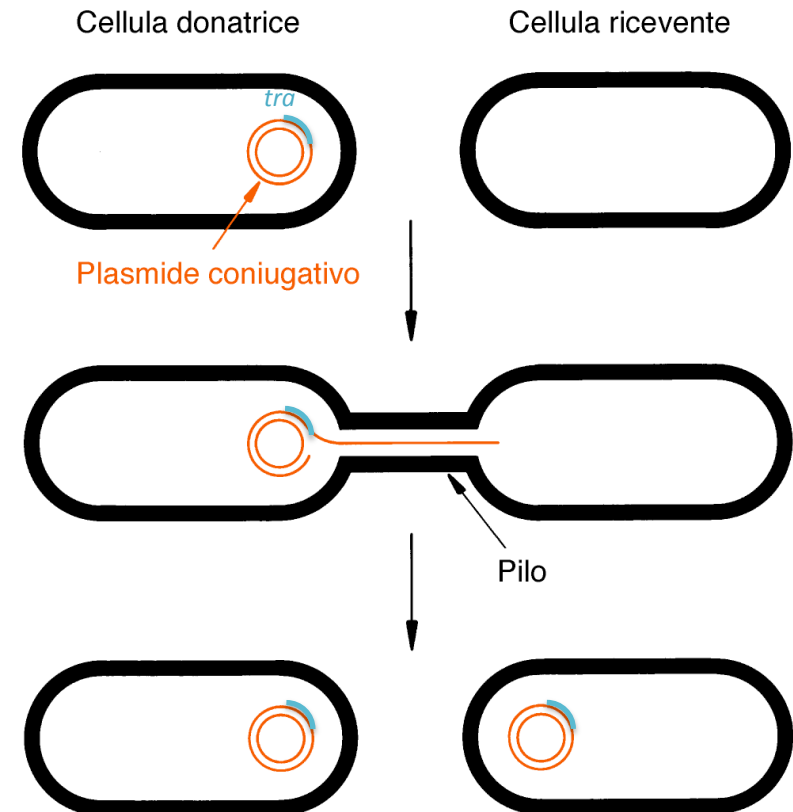
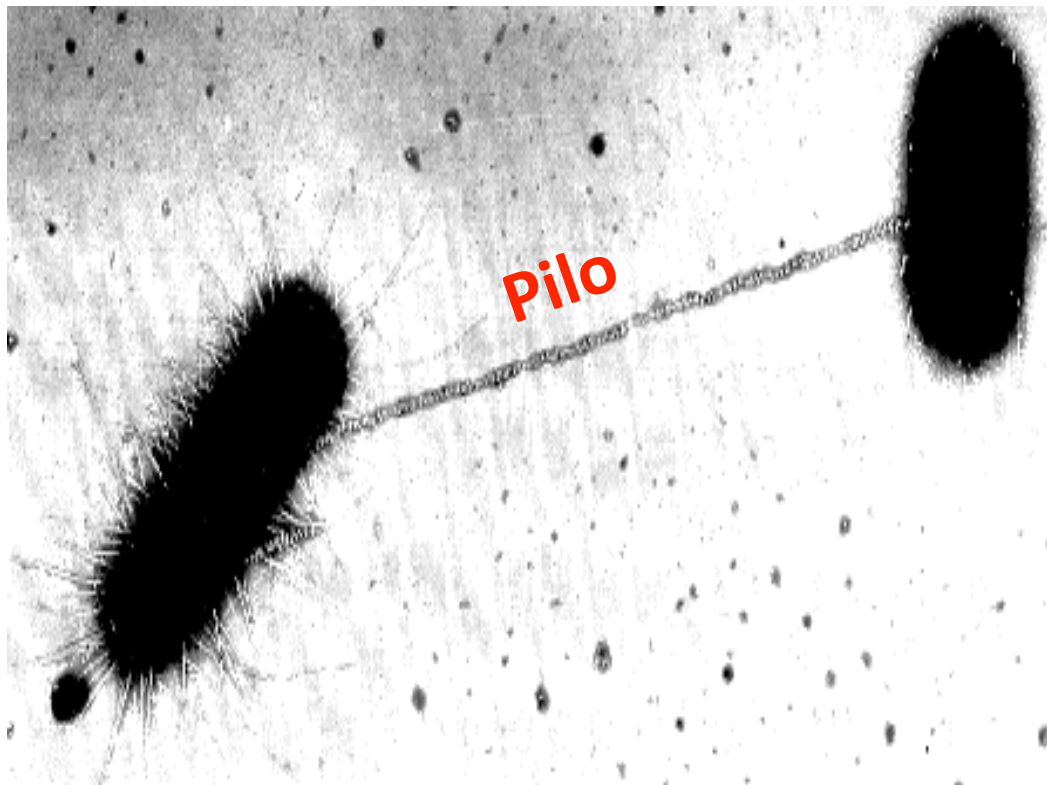
# Vettori plasmidici

- Molecole extracromosomali di DNA circolare superavvolto a doppio filamento (da 1-250 Kb), capaci di replicarsi e di segregare autonomamente rispetto al DNA cromosomico dei batteri.
- Portatori di **geni** che conferiscono ai batteri un vantaggio selettivo in particolari condizioni ambientali
- Numero di copie caratterizzante che va da 1 a oltre 50 molecole per cellula (ColE1  $\approx$  15 copie per cellula)  $\rightarrow$  in media 50-100 piccoli e 1-2 grandi che si riproducono in maniera indipendente
- Possono essere facilmente purificati da una coltura cellulare in grande quantità
- Stanley Cohen postulò l'uso dei plasmidi come **vettori** cioè in grado di accettare, trasportare e duplicare altri pezzi di DNA (pSC101)



# Classificazione: Plasmidi coniugativi e non coniugativi

I plasmidi coniugativi promuovono la **coniugazione sessuale** fra cellule batteriche  
→ diffusione del plasmide



- gruppi di incompatibilità → Fino a 7 tipi diversi di plasmidi per cellula

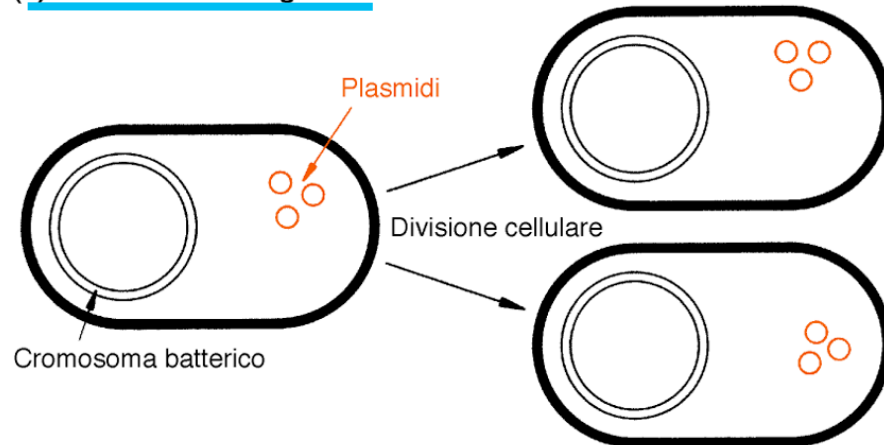


# Classificazione dei plasmidi naturali → geni codificati

- **Plasmidi della fertilità (F)**: solo geni *tra* → promuovono il trasferimento coniugativo (Plasmide F di *Escherichia coli*).
- **Plasmidi della resistenza (R)**: portano geni che conferiscono resistenza ad antibiotici (RP4 in *Pseudomonas*).
- **Plasmidi Col**: codificano per colicine, proteine tossiche per altri batteri (ColE1 in *Escherichia coli*).
- **Plasmidi degradativi**: permettono all'ospite batterico di metabolizzare molecole insolite come toluene, ac. Salicilico (TOL in *Pseudomonas putida*).
- **Plasmidi della virulenza**: conferiscono patogenicità all'ospite.
  - Plasmide Ti in *Agrobacterium tumefaciens*: malattia della galla del colletto;
  - Plasmide che codifica per le tossine insetticide di *Bacillus thuringiensis*;
  - Plasmide che codifica la neurotossina di *Clostridium botulinum*.

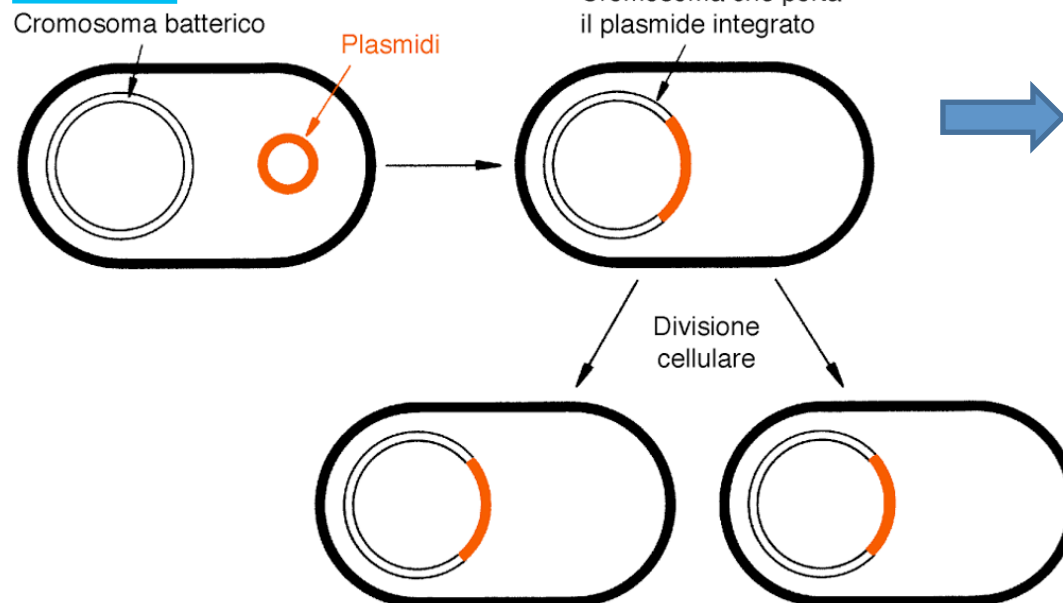
# Classificazione in base allo stato di permanenza nell'ospite

## (a) Plasmide non integrativo



Possiedono almeno una sequenza di DNA che funge da origine di replicazione, così da potersi replicare nella cellula in modo indipendente.

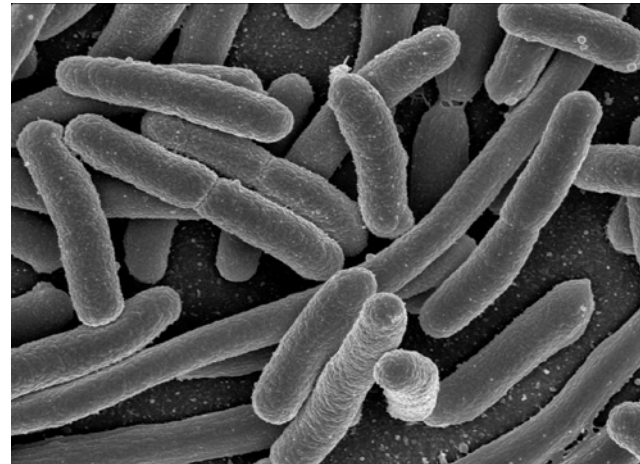
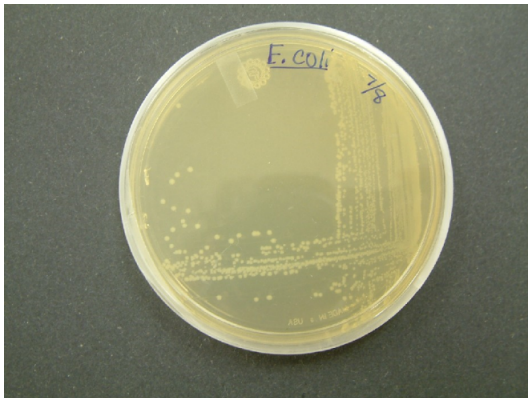
## (b) Episoma



Sono capaci di replicarsi inserendosi nel cromosoma batterico e possono essere mantenuti in questa forma per numerose divisioni cellulari.

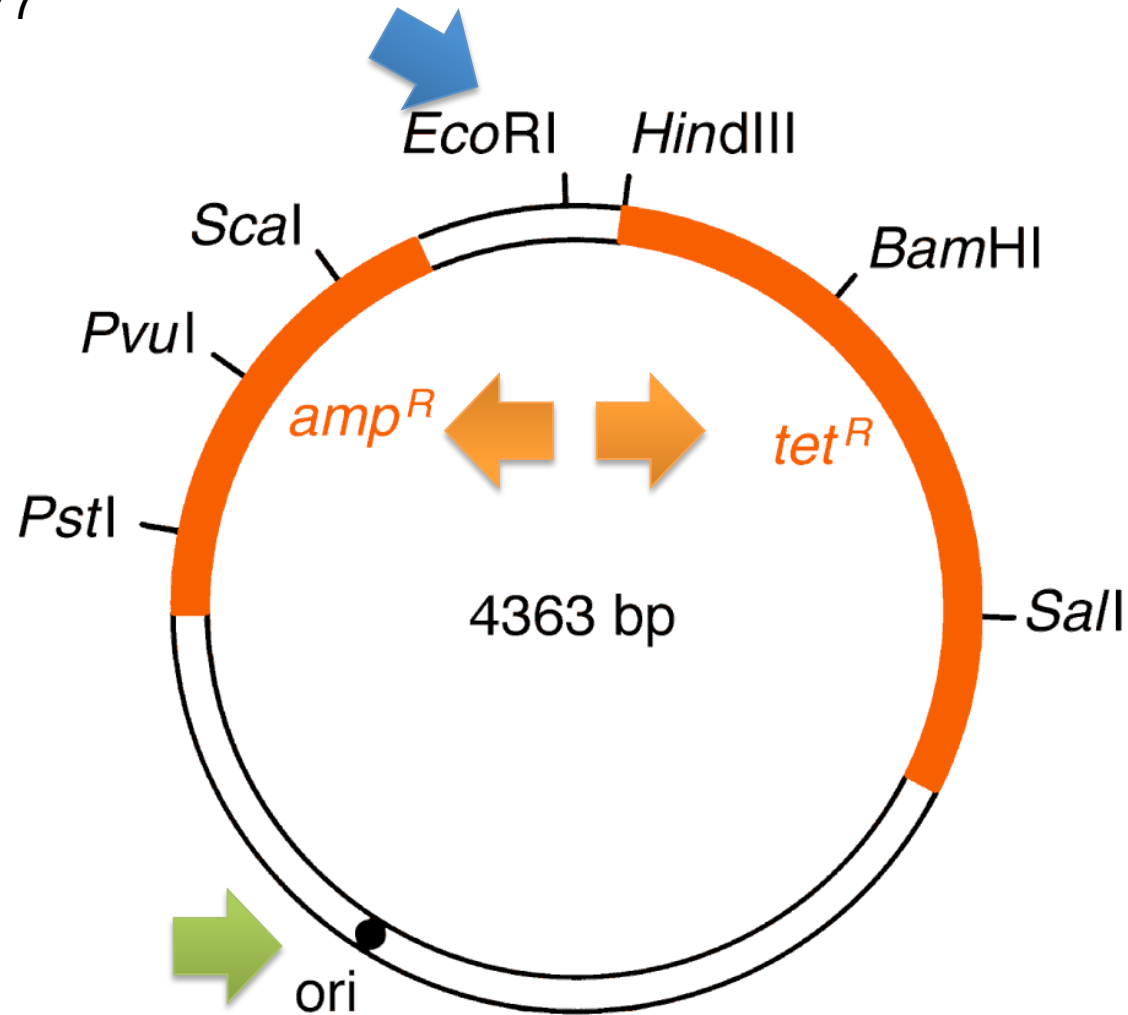
# *Escherichia coli*

- Procariote di 3 micrometri di lunghezza.
- Cresce sia in condizioni aerobiche che anaerobiche.
- Utilizzato da più di 50 anni come organismo modello per la ricerca biologica, biochimica, genetica.
- Ampia conoscenza del genoma (elevato numero di ceppi mutanti).
- Tempo di riproduzione in fase logaritmica: circa 22 minuti a 37°C in terreni adeguati.
- Ospita plasmidi naturali, coniugativi e non coniugativi (anche contemporaneamente).
- Può essere infettato da batteriofagi



# Il vettore pBR322

- uno dei primi vettori artificiali sviluppato da Bolivar e Rodriguez (Boyer's Lab) nel 1977



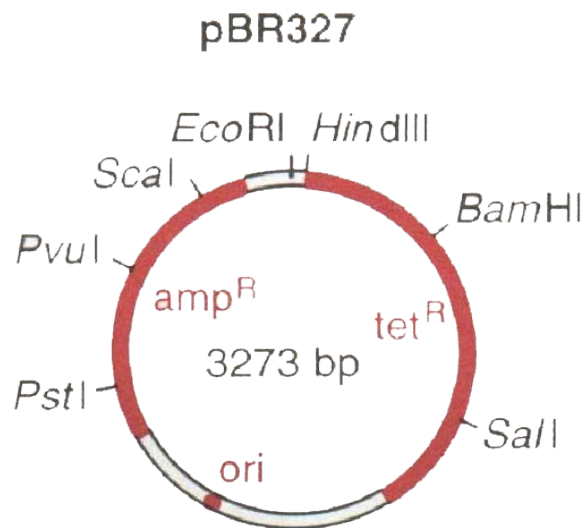


# Il pedigree di pBR322

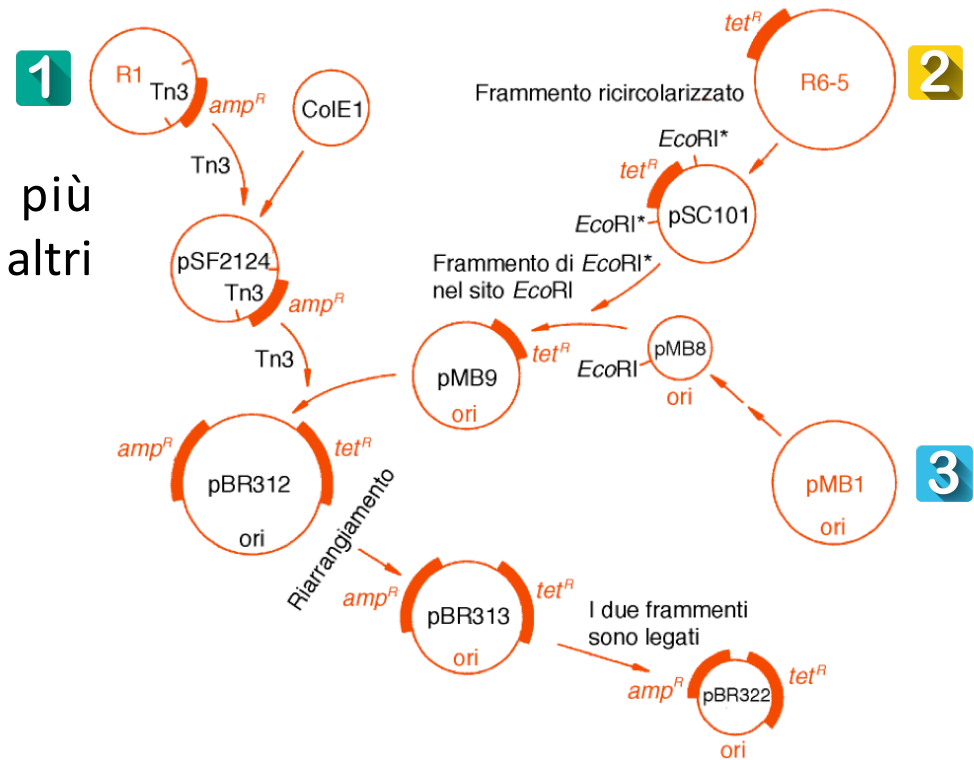
Attualmente pBR322 non viene più utilizzato, ma è servito per sviluppare altri vettori più funzionali.

## pBR327:

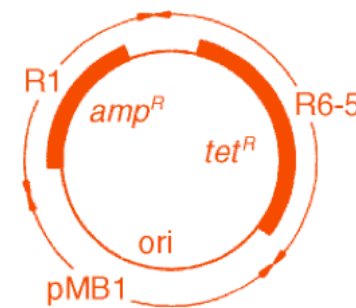
- dimensioni <
- > n° di copie (40 vs 15)
- perdita capacità coniugativa



(a) Costruzione di pBR322




(b) Le origini di pBR322

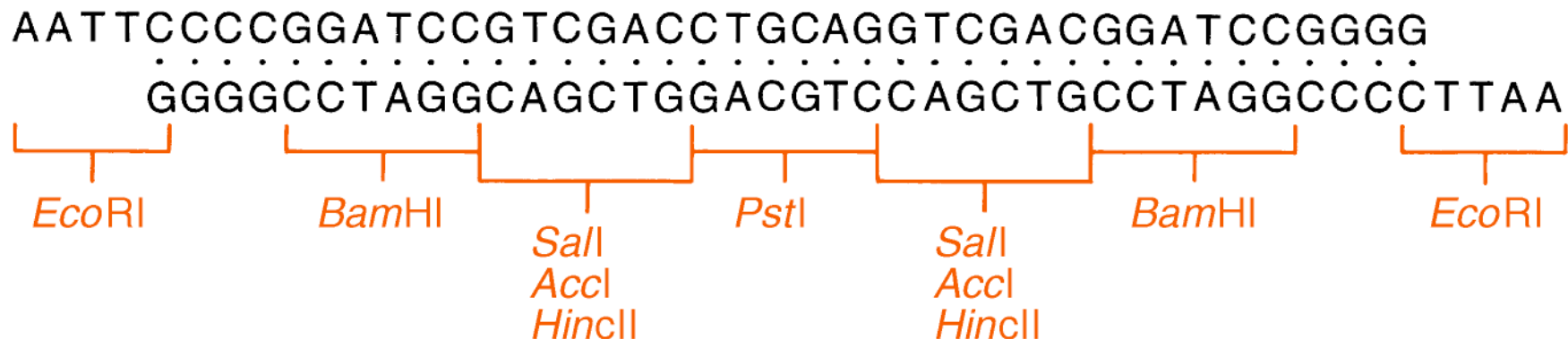




# Caratteristiche dei vettori moderni

- Dimensioni ridotte: circa 2,7-3,0 Kb → possono alloggiare frammenti di DNA più grandi.
- Alta efficienza di trasformazione .
- Alto numero di copie per cellula (500-700). 
- Vettori shuttle.
  
- Introduzione di un sito di policlonaggio (*polylinker*), cioè un segmento in cui sono concentrati numerosi siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione.

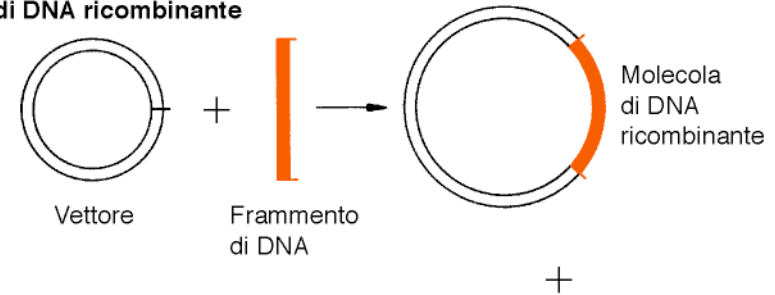
## (a) Il polylinker



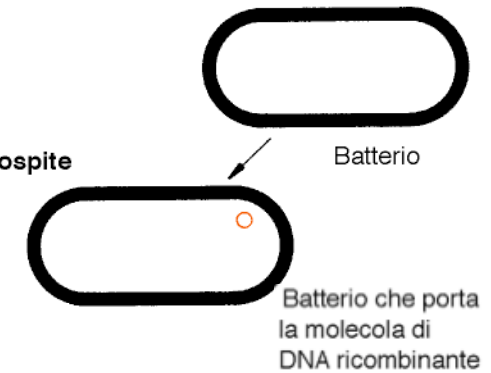
# CLONAGGIO

- Estrazione del DNA
- Costruzione delle molecole di DNA ricombinante
- Trasformazione
- Selezione della colonia di interesse
- Espansione
- Purificazione del DNA plasmidico

## 1 Costruzione di una molecola di DNA ricombinante

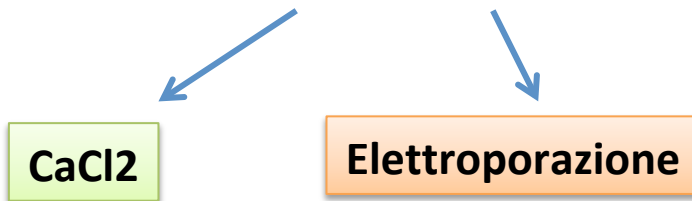


## 2 Trasporto nella cellula ospite



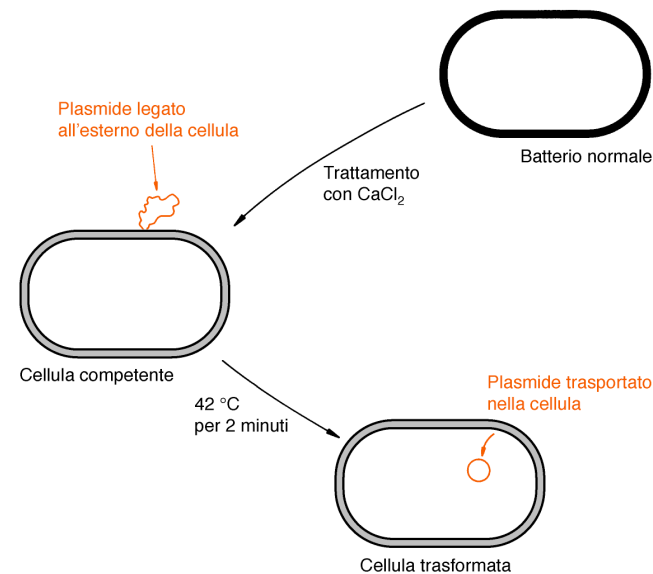
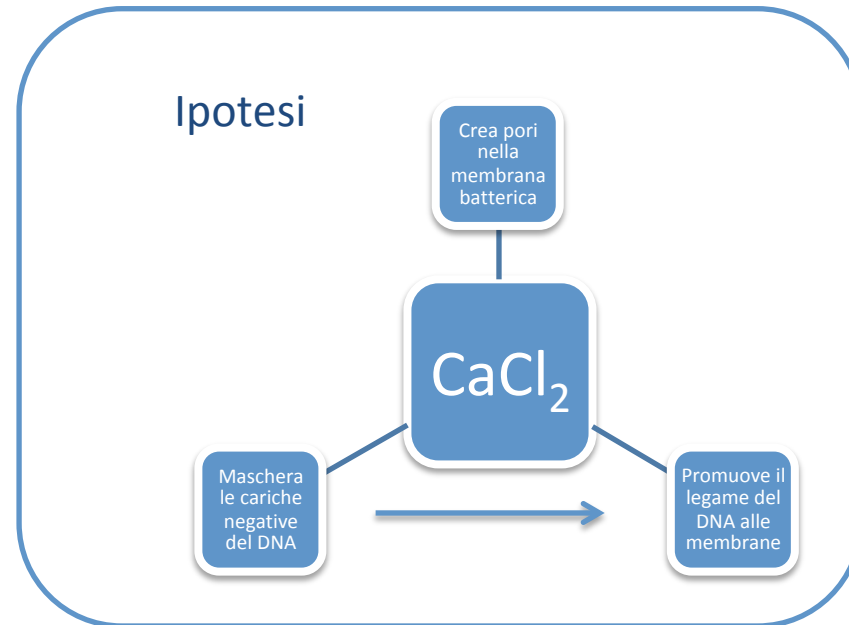
# Trasformazione batterica

- Molti batteri sono in grado di acquisire molecole di DNA dall'esterno, ma questo processo non avviene con facilità.
- É possibile indurre in molte specie di batteri una competenza artificiale alla trasformazione attraverso l'uso di agenti chimici (Mandel & Higa 1970) o fisici → la competenza è fortemente influenzata dal genotipo del ceppo.
- Le cellule così trattate in grado di acquisire DNA nudo dal mezzo esterno si dicono **competenti**.
- La trasformazione di E. coli si può ottenere con metodi chimici o fisici

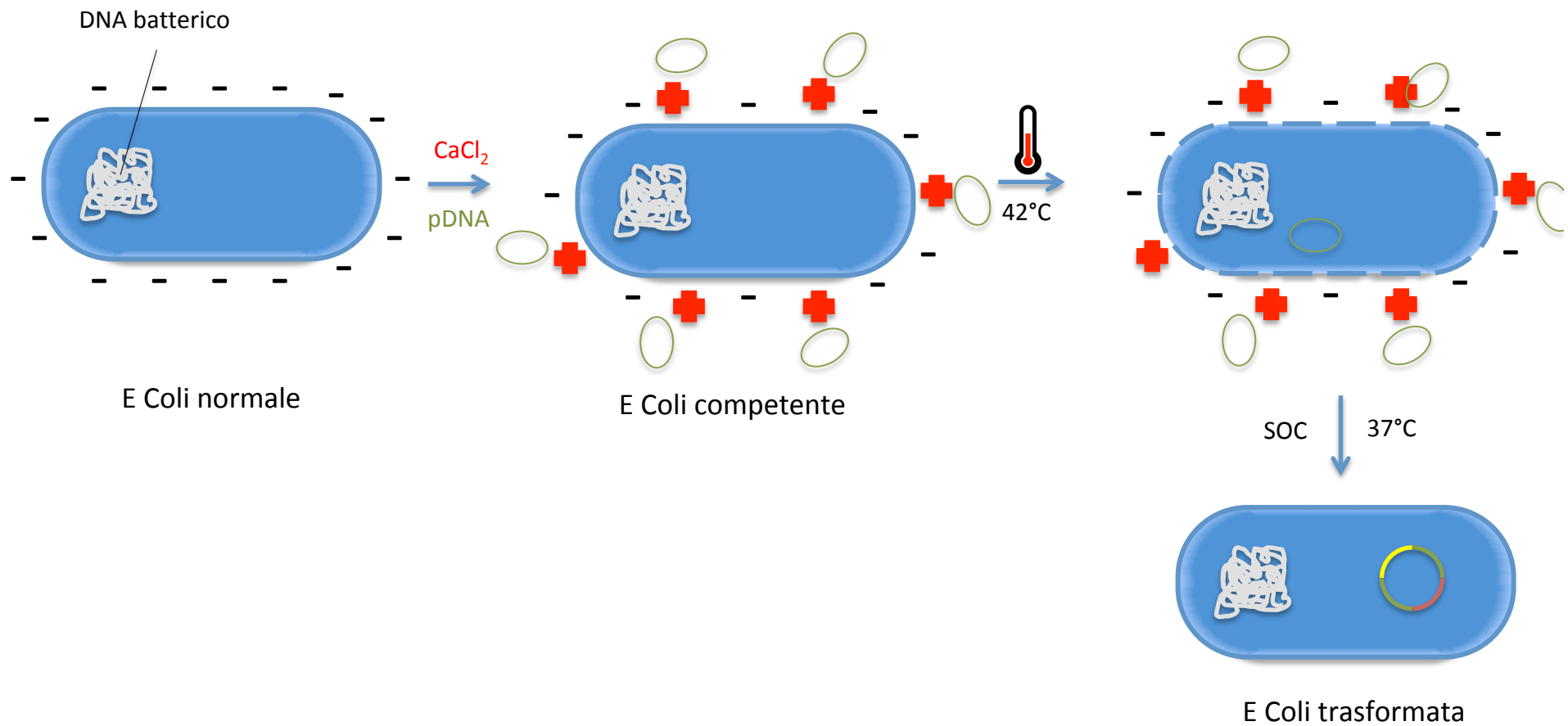


# Trasformazione mediante calcio cloruro

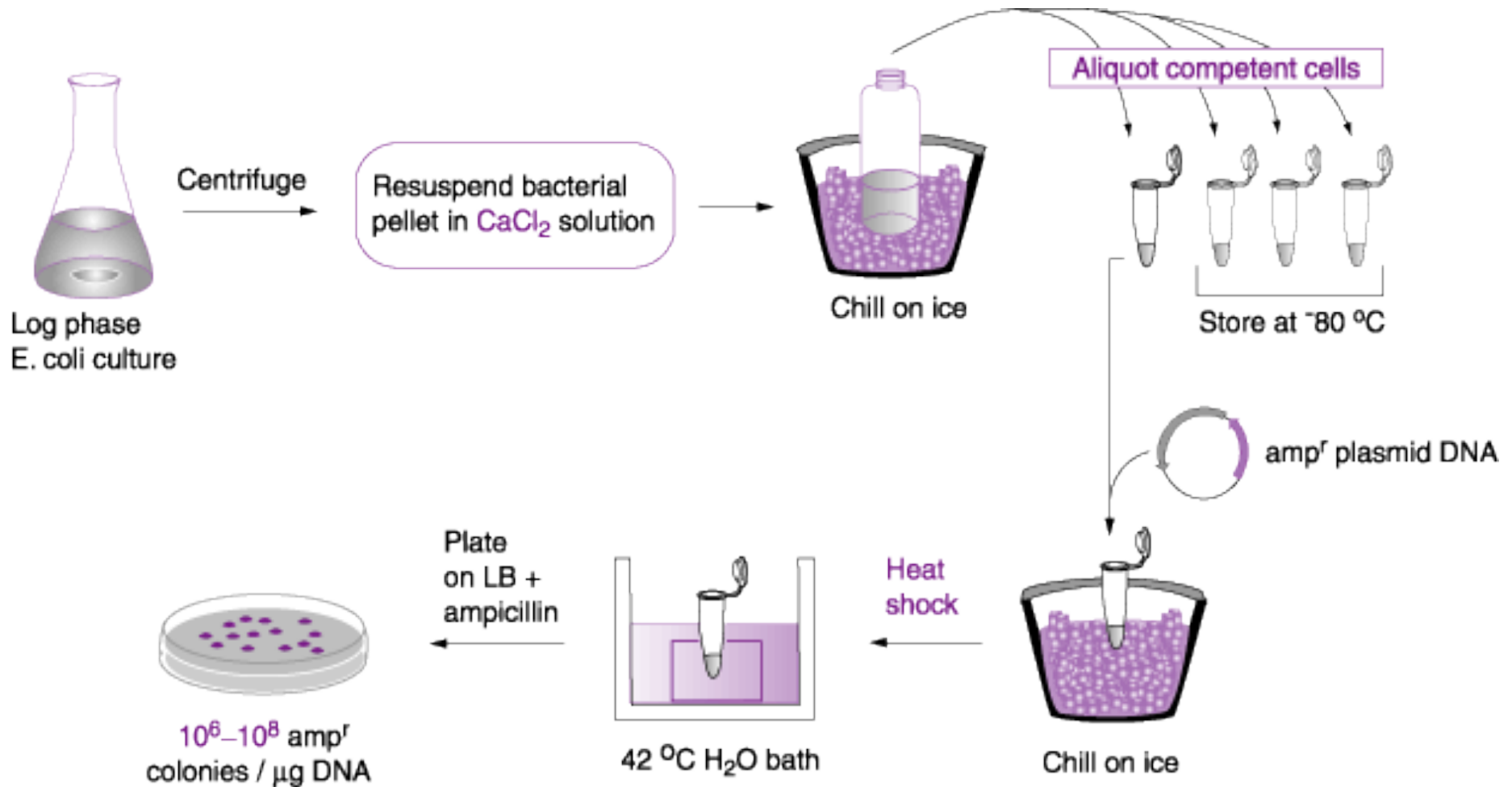
- Batteri in soluzioni fredde di ioni bivalenti lasciano entrare il DNA nudo in modo più efficiente.
- Trattamento delle cellule con soluzione **50 mM di  $\text{CaCl}_2$  + Shock termico a  $42^\circ$**
- È un metodo riproducibile ma con un'efficienza molto bassa (circa 1:10000 colonie per  $\mu\text{g}$  DNA, 0.01%)
- $10^5 - 10^6$  colonie trasformate per mg di DNA plasmidico superavvolto dal protocollo di Mandel & Higa 1970 (oggi  $10^6 - 10^9$  colonie per  $\mu\text{g}$ )



# CaCl<sub>2</sub> e competenza batterica

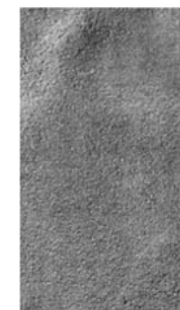
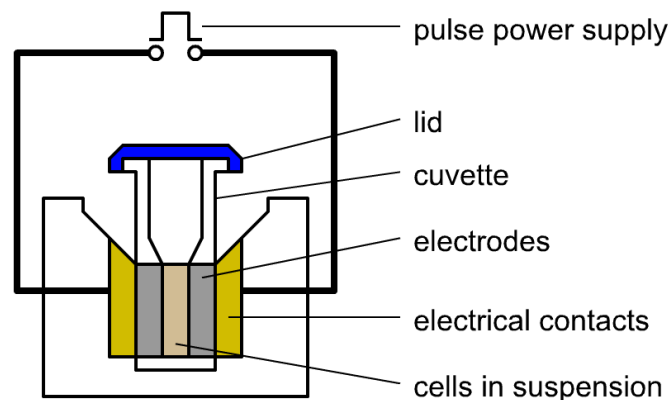
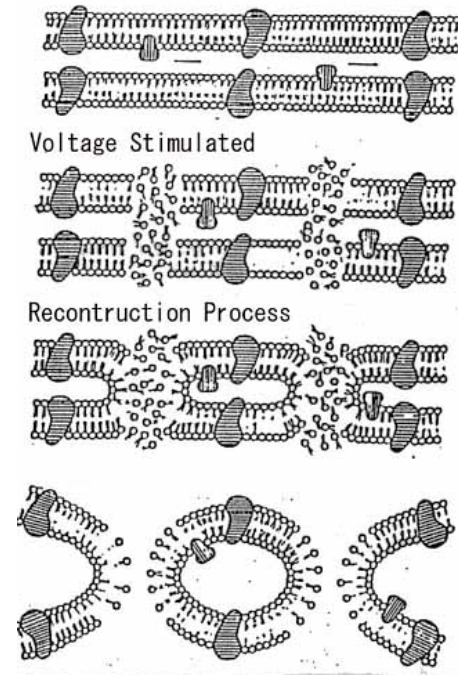


# Metodo Chimico

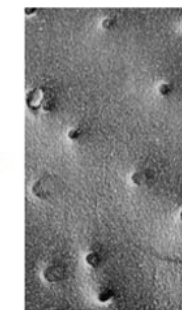


# Trasformazione mediante elettroporazione

- Le cellule di E. coli vengono sottoposte ad un campo elettrico con impulsi di voltaggio elevato (12,5-15 kV/cm).
- Ciò sembra destabilizzare le membrane inducendo la formazione di pori transienti
  - di dimensioni tali che il DNA potrebbe attraversarli senza interazioni
  - piccoli ma che interagendo attraverso componenti di membrana con il DNA lo lascerebbero transitare.
- Circa il 50% delle cellule non sopravvivono allo shock elettrico, ma l'efficienza di trasformazione è molto + elevata (>50%) →  $10^{10}$  colonie per  $\mu\text{g}$  di DNA



Cell Membrane Before Pulse

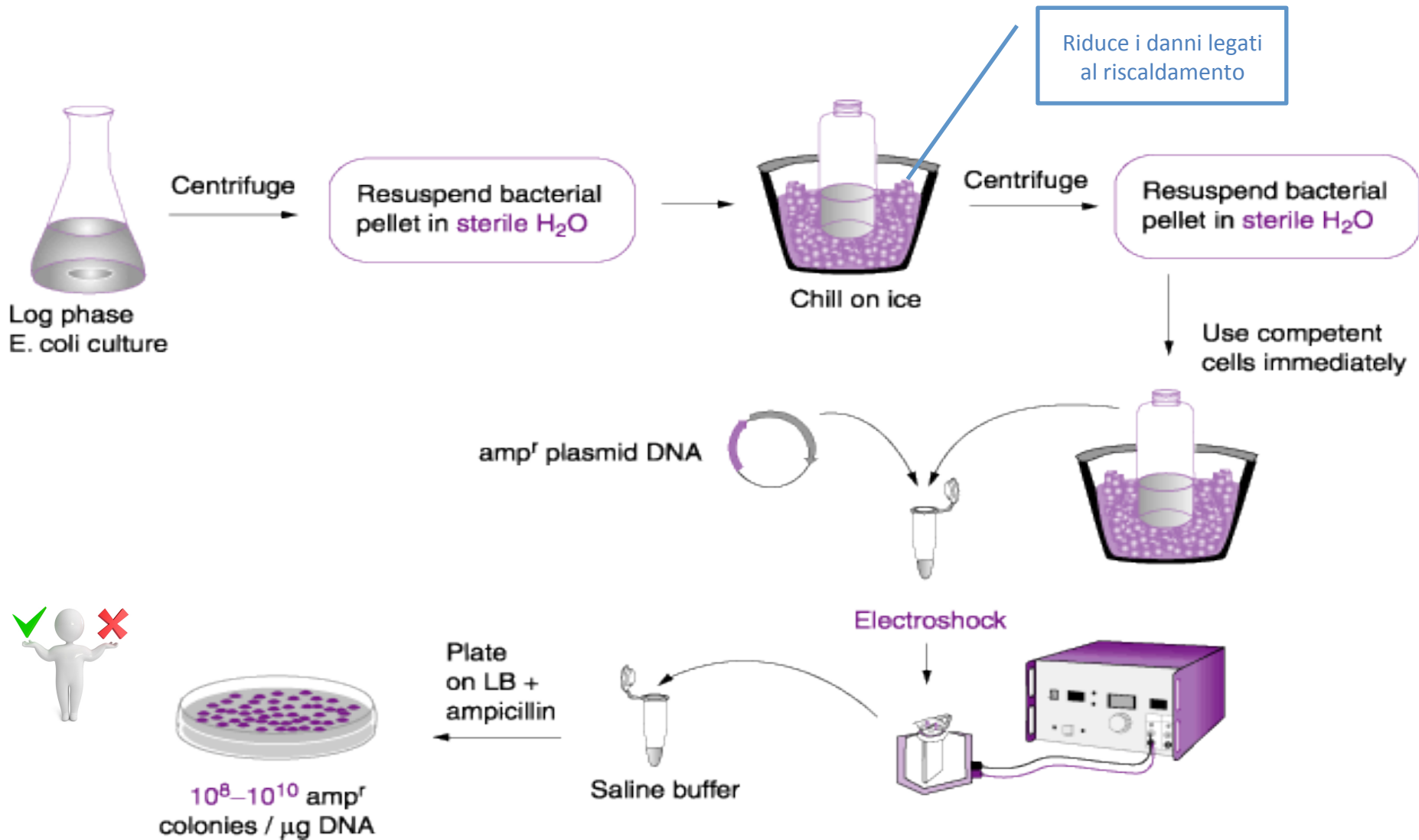


Cell Membrane During Pulse



Cell Membrane After Pulse

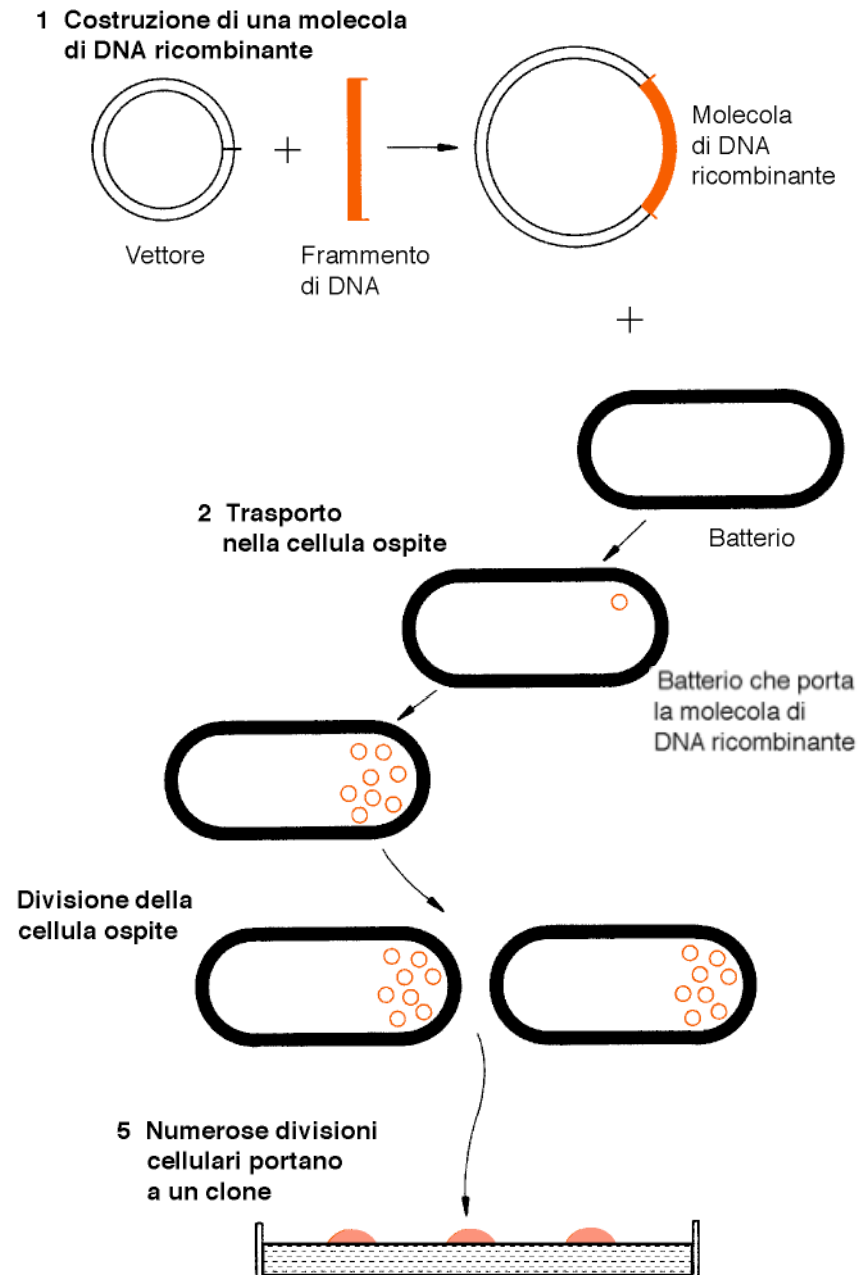
# Elettroporazione



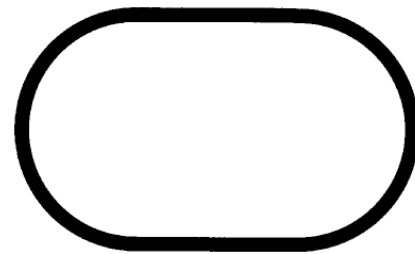


# CLONAGGIO

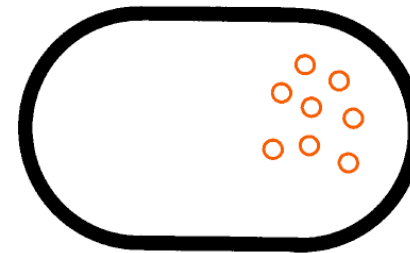
- Estrazione del DNA
- Costruzione delle molecole di DNA ricombinante
- Trasformazione
- Selezione della colonia di interesse
- Espansione
- Purificazione del DNA plasmidico



La maggior parte dei vettori plasmidici utilizza come marcatori selezionabili, geni che conferiscono resistenza agli antibiotici (ampicillina, tetraciclina, etc.).



Cellula normale di *E. coli*  
(nessun plasmide)



Cellula di *E. coli*  
contenente  
plasmidi  
pBR322

Non sopravvive

Sopravvive  
e produce una colonia

La piastratura su mezzo  
selettivo permette di  
distinguere i trasformanti  
dai non trasformanti



Agar contenente 40  $\mu\text{g/ml}$  di ampicillina,  
15  $\mu\text{g/ml}$  di tetraciclina o una combinazione di entrambe