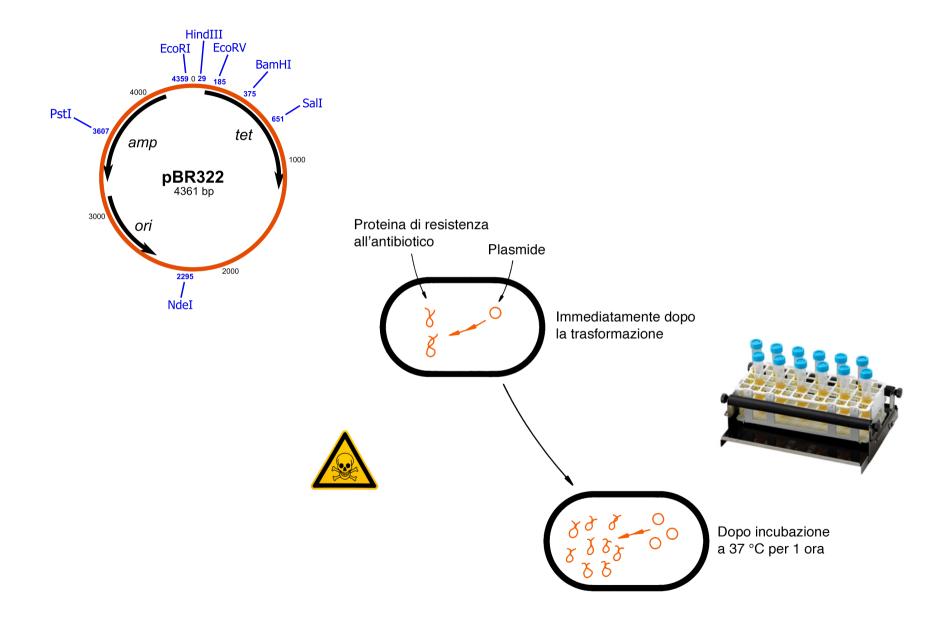
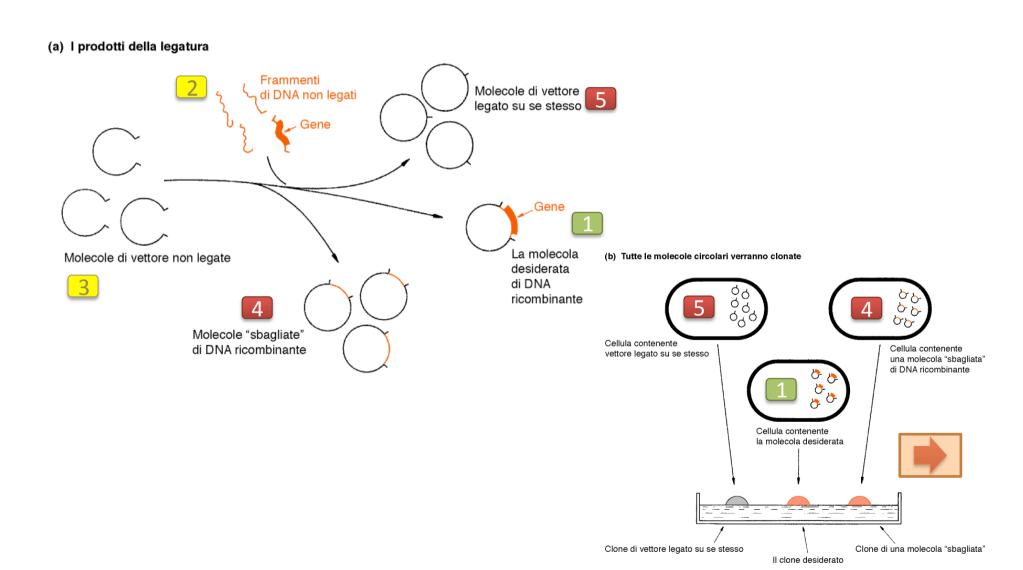
# La resistenza non deve solo essere presente, ma espressa



# I trasformanti



# Selezione per inattivazione del marcatore

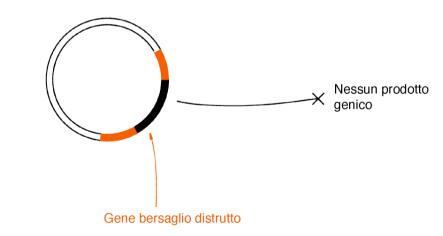
L'inserzione di un frammento di DNA distrugge l'integrità di uno dei geni presenti sulla molecola.

È possibile identificare i ricombinanti in quanto la caratteristica codificata dal gene inattivo non è più posseduta dalle cellule ospiti (inattivazione inserzionale).

#### (a) Molecola normale del vettore

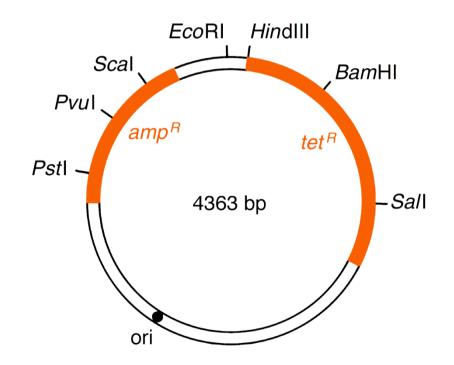


#### (b) Molecola ricombinante del vettore



### Selezione per inattivazione del marcatore con pBR322

- il gene per la resistenza all'ampicillina contiene siti unici per alcuni enzimi (es. *Pvul, Scal etc*)
- il gene per la resistenza alla tetraciclina contiene siti unici per altri enzimi di restrizione (es. *Bam*HI, SalI)
- *Eco*RI e *Hind*III tagliano invece in prossimità dei promotori dei geni per la resistenza.



## Selezione per inattivazione del marcatore con pBR322

Cellule con pBR322 ricircolarizzato



Crescita sia in ampicillina che tetraciclina (amp<sup>r</sup>, tet<sup>r</sup>)

Cellule con pBR322 ricombinante

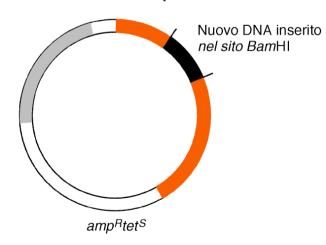


Crescita solo in ampicillina (amp<sup>r</sup>, tet<sup>s</sup>)

#### (a) La molecola del vettore normale

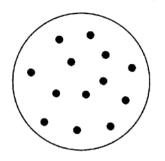


#### (b) Una molecola ricombinante di pBR322

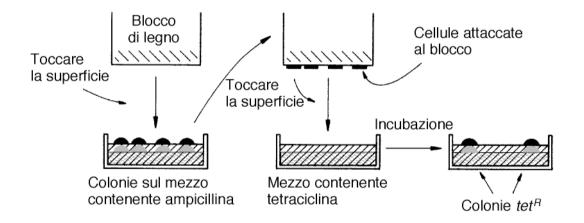


Le colonie di batteri che contengono la molecola di DNA ricombinante sono ampicillina-resistenti e tetraciclina-sensibili e si possono individuare piastrandole in replica su due terreni contenenti diverse combinazioni di antibiotici.

#### (a) Colonie su un mezzo contenente ampicillina



#### (b) Piastratura della replica

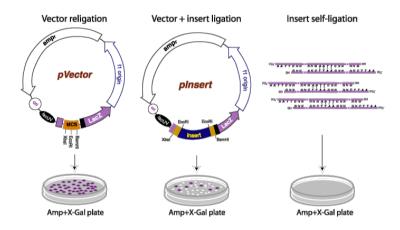


#### (c) Le colonie amp<sup>R</sup>tet<sup>R</sup> crescono sul mezzo contenente tetraciclina

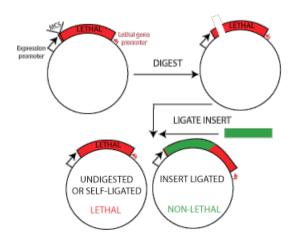


# Inattivazione inserzionale prive di effetti sulla resistenza agli Antibiotici

1. Vettori con  $\beta$ -galattosidasi  $\rightarrow \alpha$ -complementazione

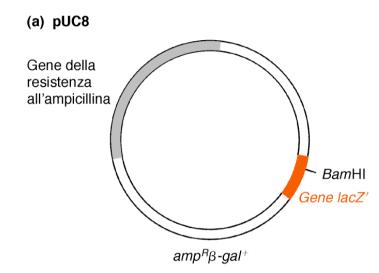


2. Positive-Selection Vectors

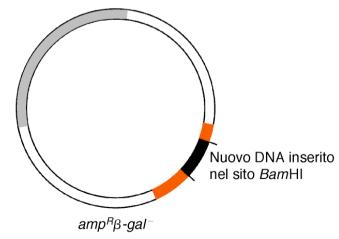


## Il vettore pUC8

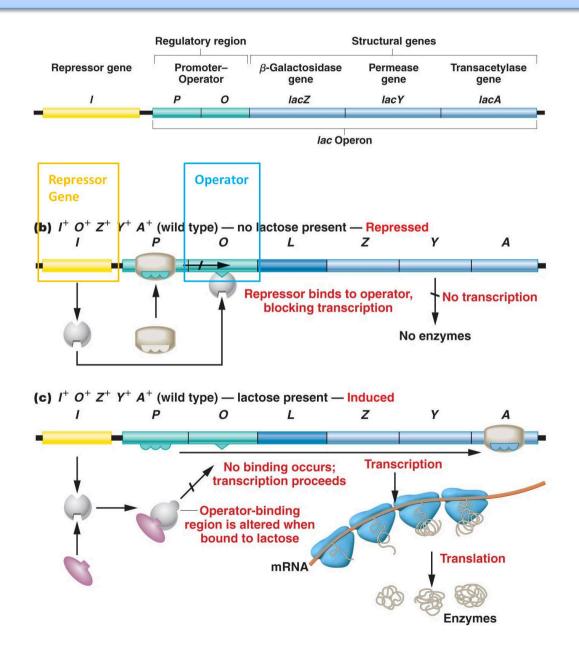
- Resistenza all'ampicillina
- Origine di replicazione mutata che consente un alto numero di copie per cellula (500-700)
- Gene lacZ', codificante per un αpeptide funzionale della β-galattosidasi
  (enzima coinvolto nella demolizione del
  lattosio in glucosio e galattosio)
- Sito di policionaggio interno al gene lacZ'



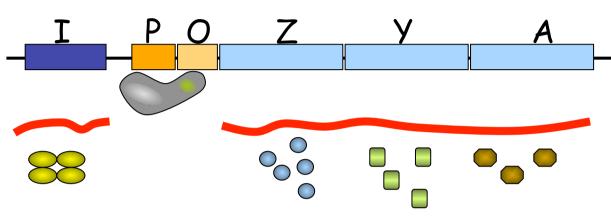
(b) Una molecola ricombinante di pUC8



# L'operone Lac



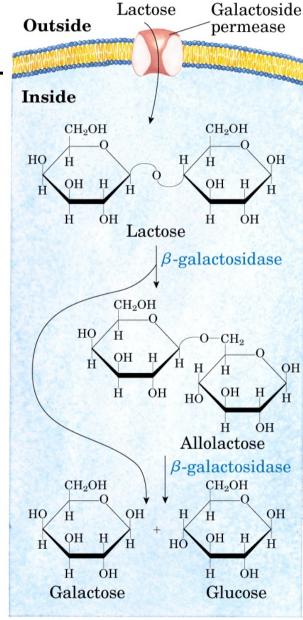
# β-galattosidasi



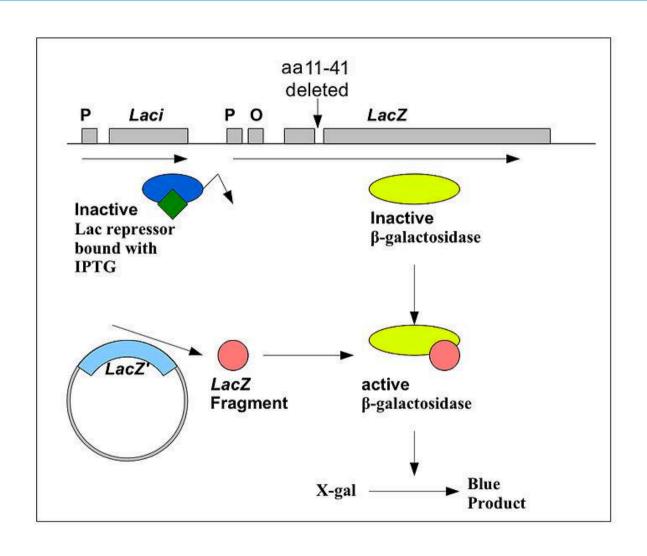
Geni strutturali

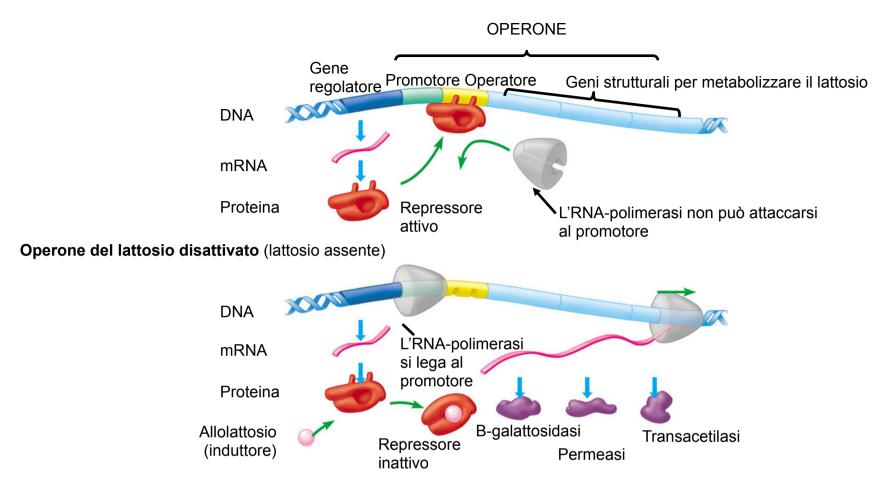
lacZ:  $\beta$ -galattosidasi

lac Y: β-galattoside permeasi lac A: β-galattoside transacetilasi



# $\alpha$ -complementazione





Operone del lattosio attivato (il repressore è disattivato dall'allolattosio)

In assenza di lattosio, il repressore blocca la trascrizione

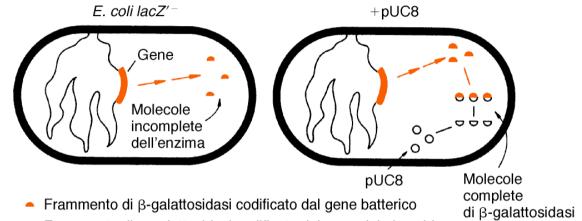
In presenza di induttore (lattosio o IPTG) si ha l'attivazione della trascrizione

# Selezione con pUC8

Il ceppo di E coli produce una β-galattosidasi non funzionante privo dell'N-terminale.

Cellule trasformate con il p l a s m i d e p U C 8 p r o d u c o n o u n a  $\beta$  - galattosidasi funzionante grazie al fenomeno dell'  $\alpha$ - complementazione

#### (a) Il ruolo del gene lacZ'

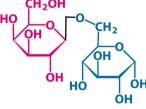


- Frammento di β-galattosidasi codificato dal gene del plasmide
- Molecola completa di β-galattosidasi



Isopropylthiogalactoside (IPTG)

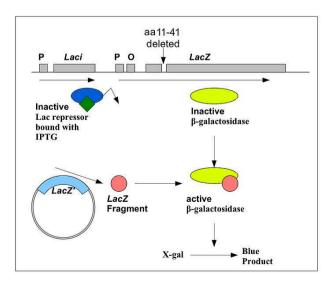
IPTG is a molecular mimic of allolactose, a lactose metabolite that triggers transcription of the lac operon



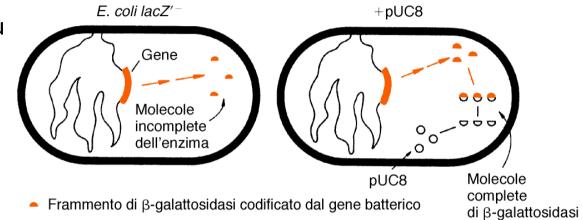
1,6-Allolactose

# Selezione con pUC8

Saggio: screening bianco/blu si fornisce l'analogo del lattosio X-gal →, che se idrolizzato dalla β-galattosidasi dà luogo ad un prodotto intensamente colorato di blu.

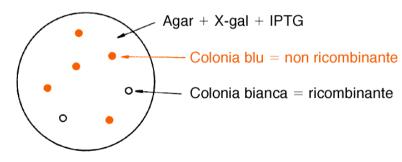


#### (a) Il ruolo del gene lacZ'



- ightharpoonup Frammento di  $\beta$ -galattosidasi codificato dal gene del plasmide
- Molecola completa di β-galattosidasi

#### (b) Screening per pUC8 ricombinanti

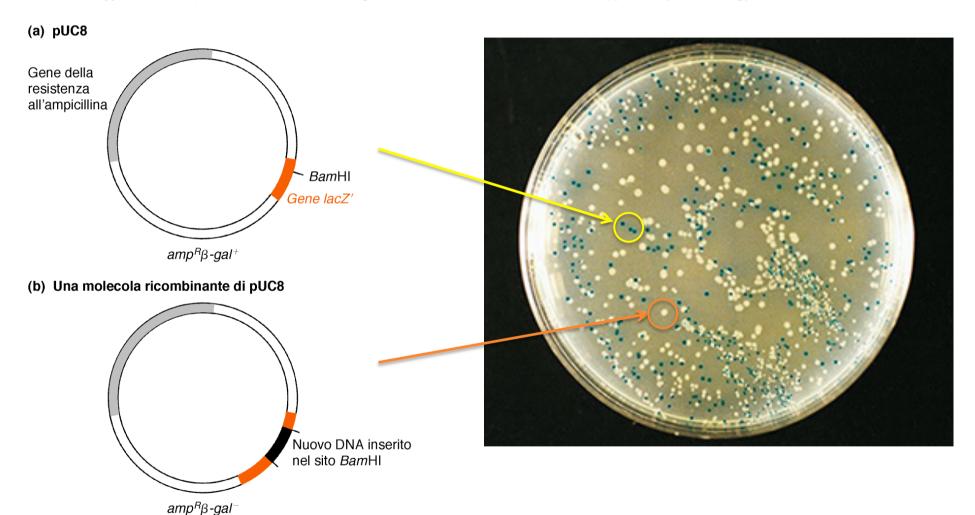


Colonie blu = β-galattosidasi sintetizzata X-gal → prodotto blu

**Colonie bianche** = β-galattosidasi non sintetizzata X-gal → nessun prodotto blu

# Selezione con pUC8

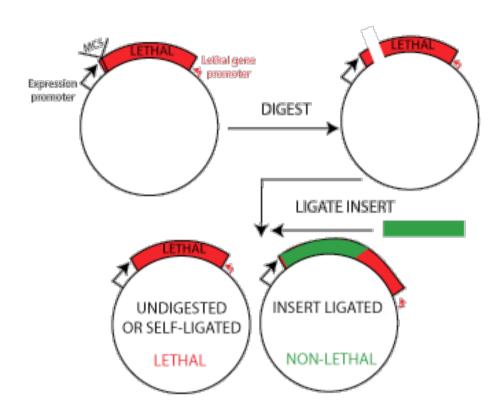
Genotype DH5α: F<sup>-</sup> φ80/acZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup>



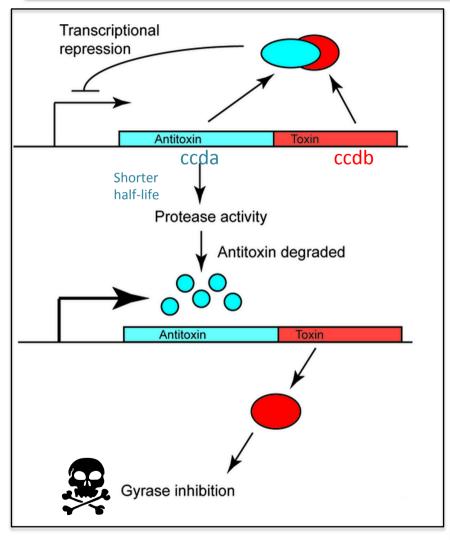
Efficace ma non influenza l'efficienza globale di clonaggio → alkaline phosphatase

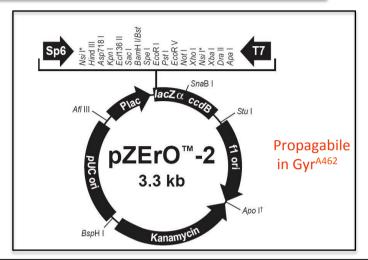
### Positive selection vectors

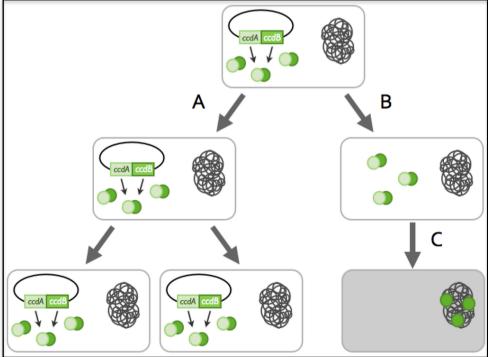
- La selezione positiva deriva dall'espressione condizionale di un gene letale (es. Endonucleasi di restrizione, tossine) all'interno del quale è inserito il sito di policionaggio
- Il gene letale è distrutto dalla ligazione dell'inserto
- Ogni vettore richiuso su se stesso mantiene una copia del gene letale e viene selezionato contro dalla trasformazione
- Consente la limitazione dell'uso degli antibiotici



# Il sistema ccd (control of cell death) tossina-antitossina

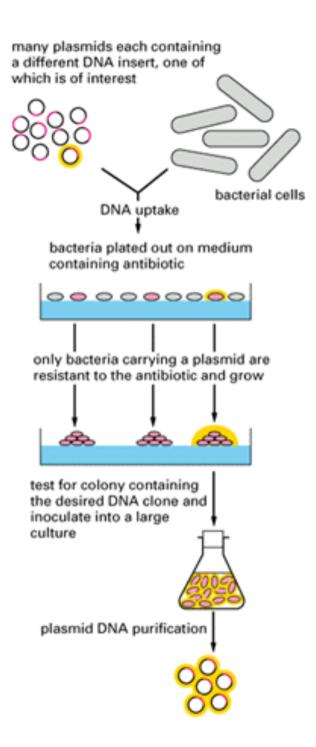




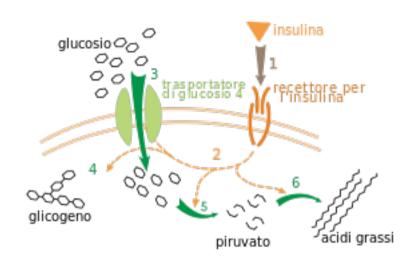


### **CLONAGGIO**

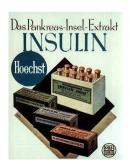
- Estrazione del DNA
- Costruzione delle molecola di DNA ricombinante
- Trasformazione
- Selezione della colonia di interesse
- Espansione
- Purificazione del DNA plasmidico



# Il primo clonaggio >> l'insulina

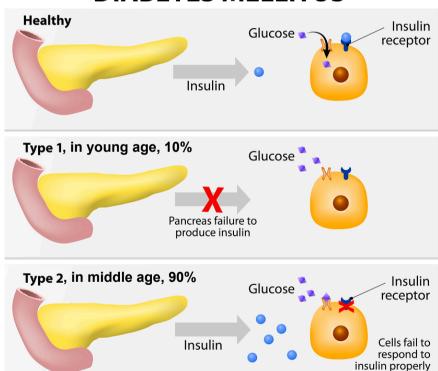


un pazienti type-1 richiede in un anno l'equivalente del pancreas di 50 maiali!

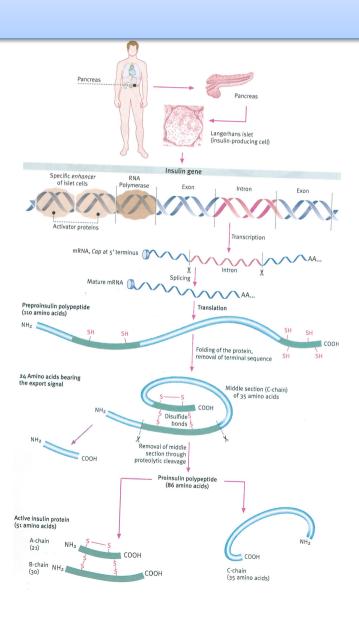




### **DIABETES MELLITUS**



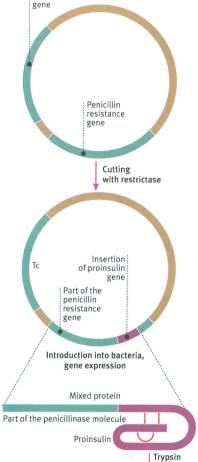
# Insulina Umana



## Insulina di ratto dai batteri







Active rat insulin

treatment

Tetracycline

resistance

Polystyrol plate

Proinsulin antibody

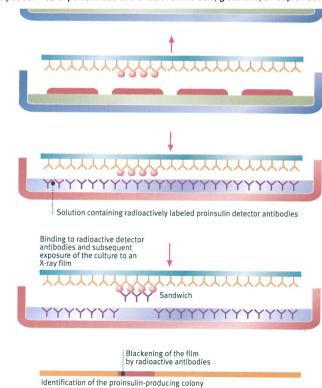
Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Aug;75(8):3727-31.

#### A bacterial clone synthesizing proinsulin.

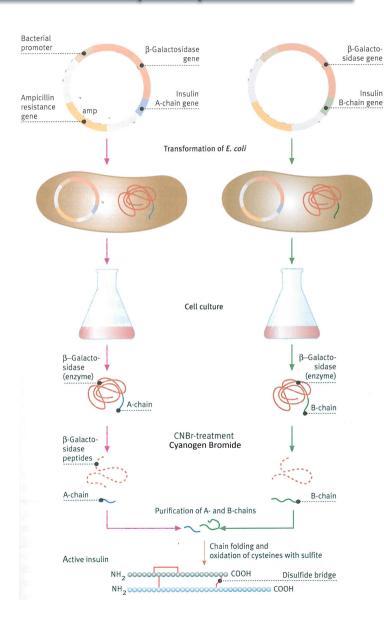
Villa-Komaroff L, Efstratiadis A, Broome S, Lomedico P, Tizard R, Naber SP, Chick WL, Gilbert W.

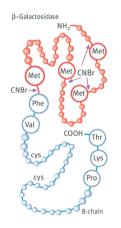
#### Abstract

We have cloned double-stranded cDNA copies of a rat preproinsulin messenger RNA in Escherichia coli chi1776, using the unique Pst endonuclease site of plasmid pBR322 that lies in the region encoding amino acids 181-182 of penicillinase. This site was reconstructed by inserting the cDNA with an oligo(dG)-oligo(dC) joining procedure. One of the clones expresses a fused protein bearing both insulin and penicillinase antigenic determinants. The DNA sequence of this plasmid shows that the insulin region is read in phase; a stretch of six glycine residues connects the alanine at position 182 of penicillinase to the fourth amino acid, glutamine, of rat proinsulin.



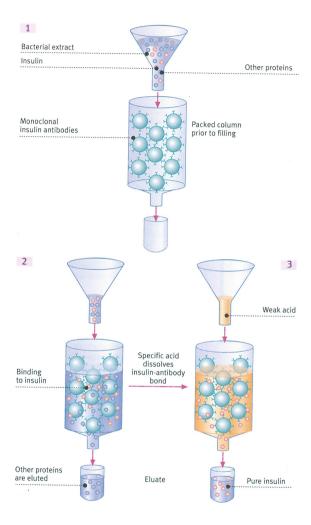
# Insulina Umana dai batteri (1979)





Cyanogen Bromide action

**Purificazione** 



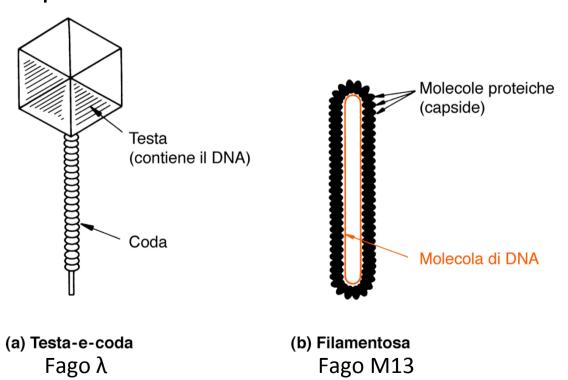
# Un vettore per ogni "stagione"

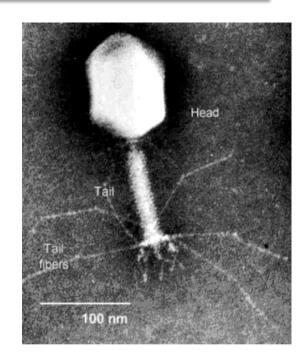


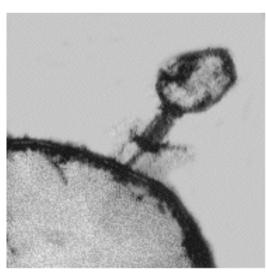
Dimensioni dell'inserto	Vettore ideale
0-10 Kb	Plasmidi
	Fago λ (inserzione)
9-23 Kb	Fago λ (sostituzione)
30-44 Kb	Cosmidi
70-100 Kb	Fago P1
130-150 Kb	PAC
	(cromosoma artificiale di P1)
Fino a 300 Kb	BAC
	(cromosomi artificiali batterici)
200-2000 Kb	YAC
	(cromosomi artificiali di lievito)

# I batteriofagi

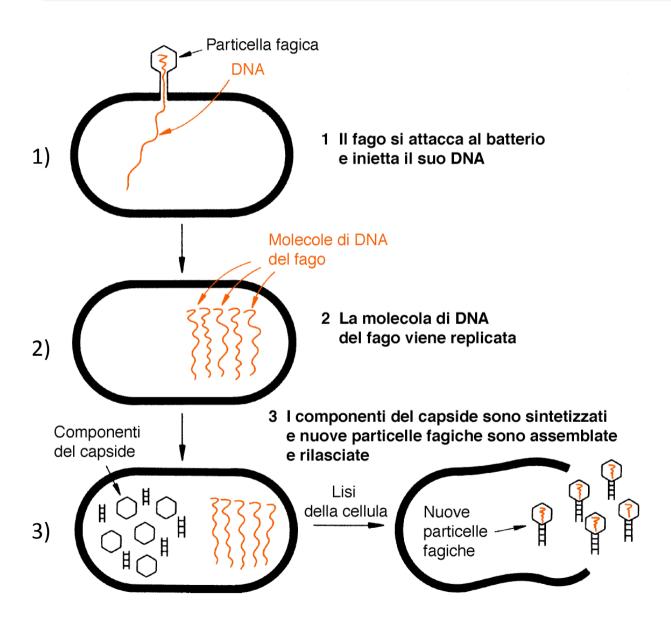
Virus che infettano batteri costituiti da una molecola di DNA (o RNA) circondata da un rivestimento proteico detto capside







### Fasi dell'infezione



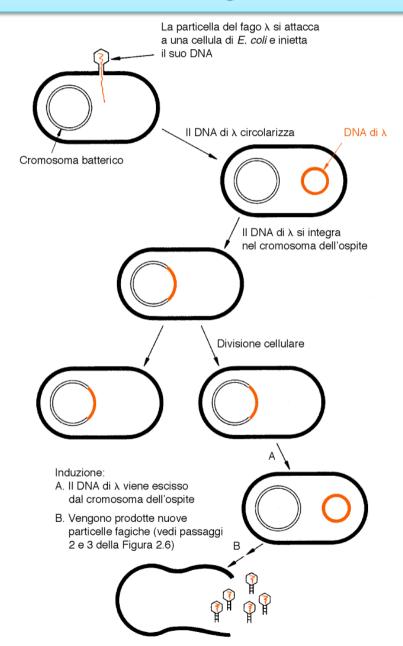
#### **Ciclo litico**

La replicazione del DNA del fago è seguita immediatamente dalla sintesi delle proteine del capside e la molecola di DNA del fago non è mantenuta in una condizione stabile nella cellula ospite.

# Fasi dell'infezione: ciclo lisogeno di λ

A differenza del ciclo litico, l'infezione lisogena è caratterizzata dalla ritenzione della molecola del DNA del fago del batterio ospite, anche per molte divisioni cellulari.

La forma integrata del DNA del fago viene detta profago ed il batterio che lo contiene, lisogeno



# λè un fago temperato

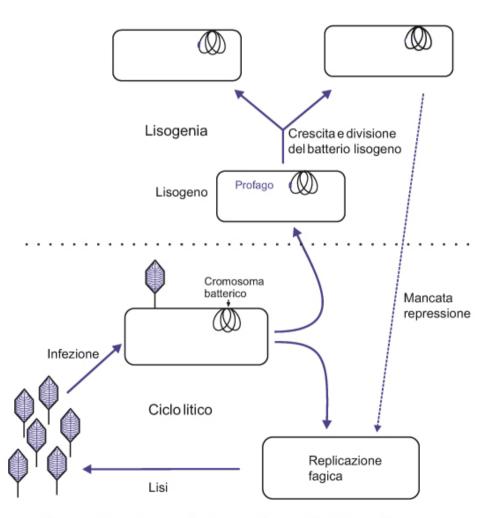
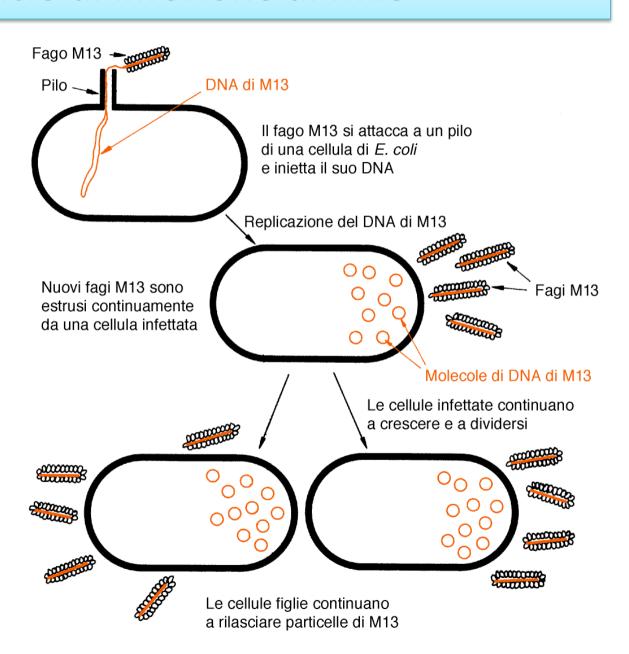


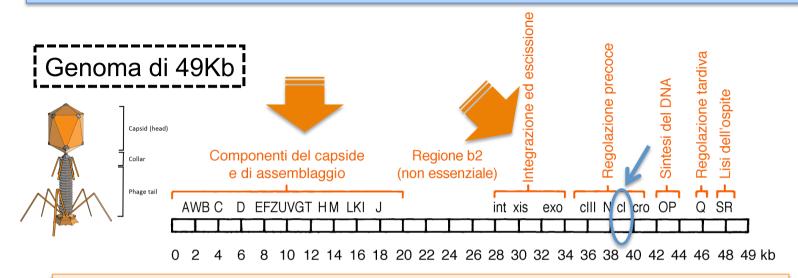
Figura 2.24 Crescita del batteriofago: ciclo litico e lisogeno.

### Il ciclo di infezione di M13

Il DNA di M13 non si integra nel genoma batterico; nuove particelle fagiche vengono assemblate continuamente e rilasciate dalla cellula.

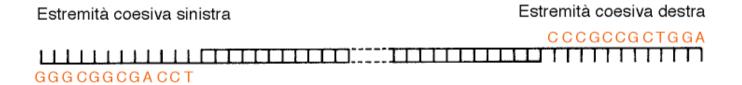


### Organizzazione e replicazione del genoma di $\lambda$



Raggruppamento di geni correlati → favorisce la regolazione coordinata

#### (a) La forma lineare della molecola di DNA di λ



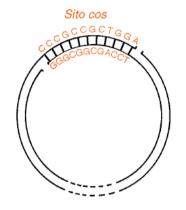
Nella forma lineare (nella particella fagica) la molecola di DNA presenta alle estremità 12 nucleotidi a singolo filamento = siti cos

### Funzione dei siti cos

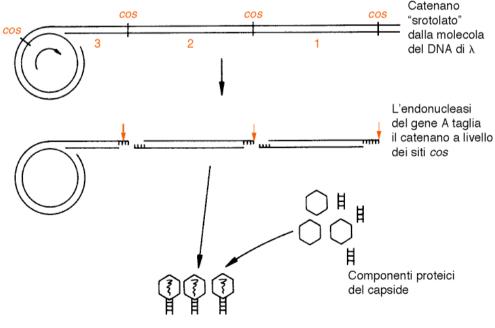
- 1. Permettono la circolarizzazione della molecola di DNA (necessaria per l'integrazione)
- 2. Permettono la replicazione massiva con meccanismo a cerchio rotante durante la fase litica.

Si ha la produzione di un catenano (serie di genomi lineari di  $\lambda$ ) che viene tagliato a livello dei siti cos da una specifica endonucleasi (gene A di  $\lambda$ )

(b) La forma circolare della molecola di DNA di  $\lambda$ 



(c) Replicazione e impacchettamento di DNA di λ



Assemblaggio di nuove particelle fagiche

### Funzione dei siti cos

- 1. Permettono la circolarizzazione della molecola di DNA (necessaria per l'integrazione)
- 2. Permettono la replicazione massiva con meccanismo a cerchio rotante durante la fase litica.

Si ha la produzione di un catenano (serie di genomi lineari di  $\lambda$ ) che viene tagliato a livello dei siti cos da una specifica endonucleasi (gene A di  $\lambda$ )

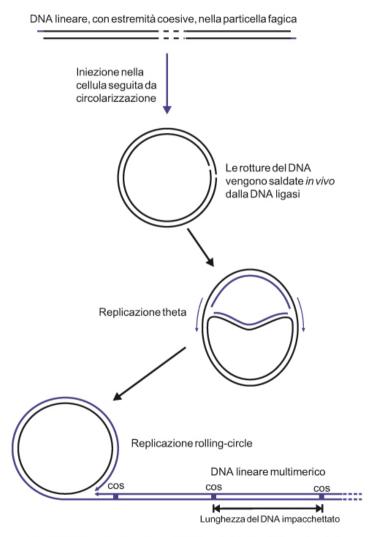
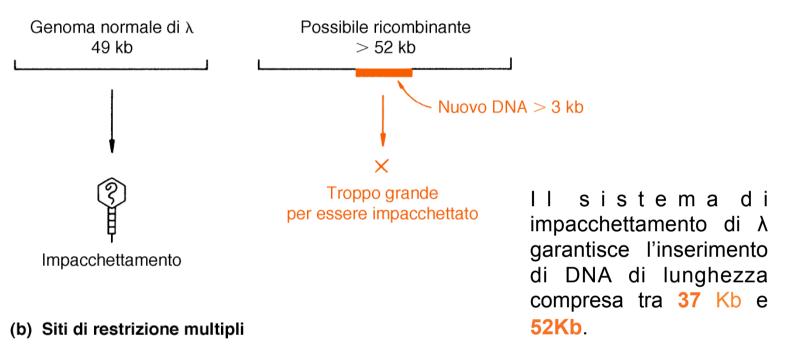
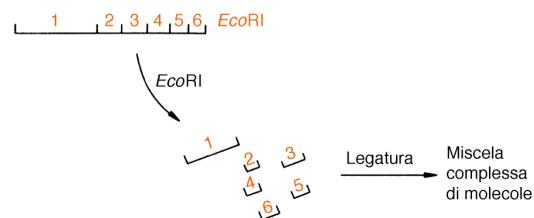


Figura 2.26 Replicazione del DNA del batteriofago lambda.

### Problemi nell'utilizzo di λ come vettore

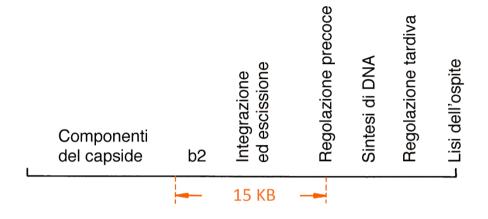
#### (a) Le limitazioni delle dimensioni

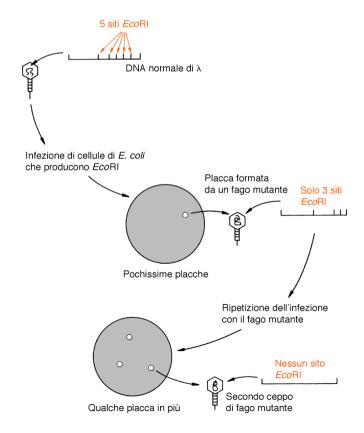




### Nonostante questo...

1 - Derivati dalla delezione di una regione non essenziale (contenente geni per l'integrazione ed escissione del profago) e dal legame dei due frammenti.

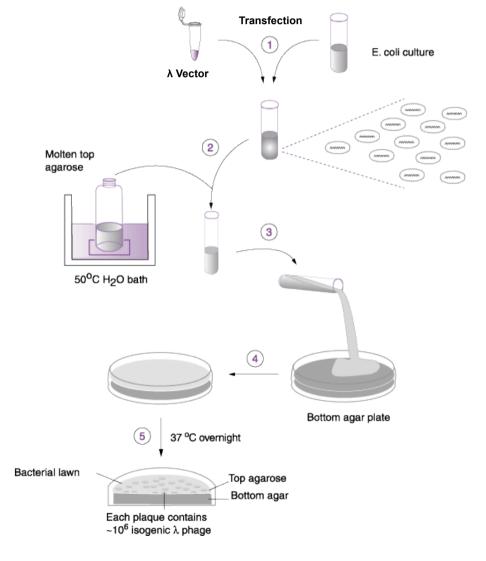




2 - Si può usare la **selezione naturale** per isolare λ modificato privo di siti di restrizione

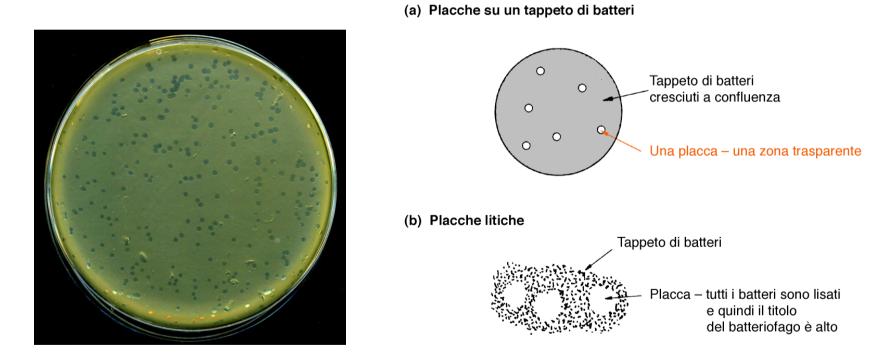
## Introduzione di DNA fagico in cellule batteriche

1) **Trasfezione:** processo equivalente alla trasformazione. Si utilizza DNA fagico al posto del plasmidico



# Colonie e placche

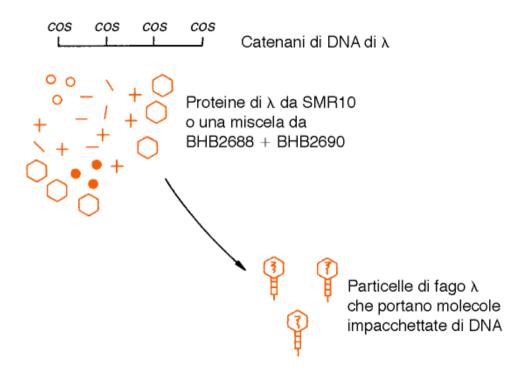
L'infezione fagica si visualizza sotto forma di placche su un tappeto di batteri. Ciascuna placca corrisponde ad una zona chiara prodotta quando i fagi lisano le cellule.



In questo caso non è necessario un gene che dia resistenza ad un antibiotico per la selezione....

### Introduzione di DNA fagico in cellule batteriche

2) **Packaging in vitro**: consiste nell'impacchettare in vitro la particella fagica che verrà utilizzata per infettare direttamente le cellule di *E. coli* 

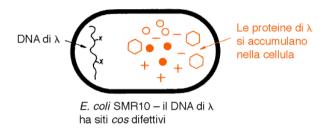


Rispetto alla trasfezione il packaging ha un'altissima efficienza

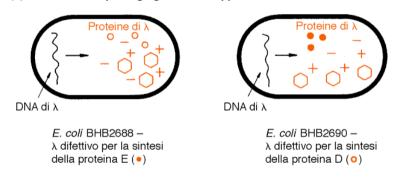
# Packaging in vitro: uso di ceppi difettivi di λ

- Le proteine necessarie vengono ottenute da E. coli utilizzando due sistemi:
- A singolo ceppo: si utilizza un DNA di λ difettivo mutato nei siti COS (non vengono riconosciuti da endonucleasi; non si ha replicazione).
- 2) <u>Doppio ceppo:</u> si utilizzano due DNA di λ difettivi per due componenti diverse del capside.

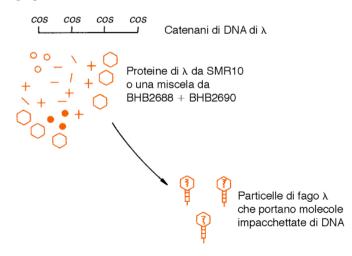
(a) Un sistema di packaging con un singolo ceppo



(b) Un sistema di packaging con due ceppi



(c) Packaging in vitro



### Vettori di λ di inserzione

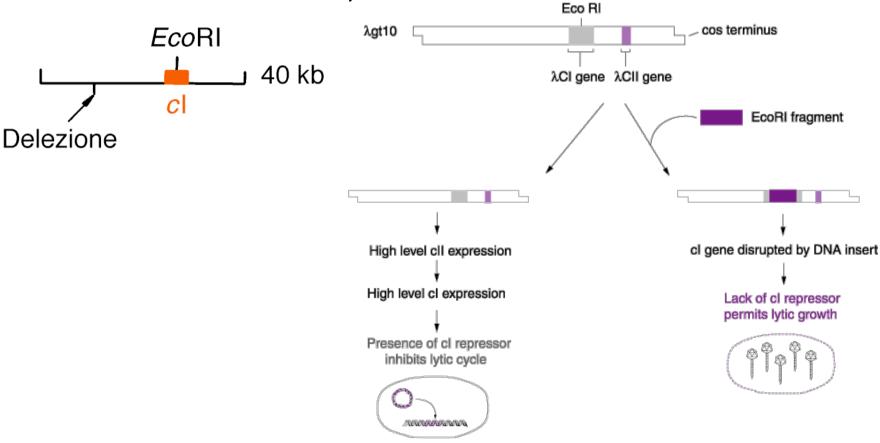
#### (a) Costruzione di un vettore $\lambda$ di inserzione



Un vettore di inserzione possiede almeno un sito di restrizione unico in cui si può inserire nuovo DNA

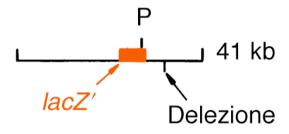
### Vettori λ di inserzione

**λgt10:** può ospitare fino a ~ 8kb, sistema di selezione per inattivazione inserzionale del gene cl (placche trasparenti invece che torbide)

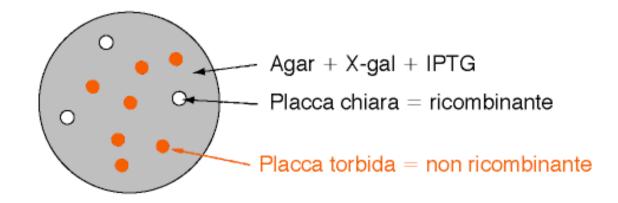


# Vettori \(\lambda\) di inserzione

**λΖΑΡΙΙ:** ospita fino a 10Kb di DNA, sistema di selezione lacZ' (placche chiare invece che blu)

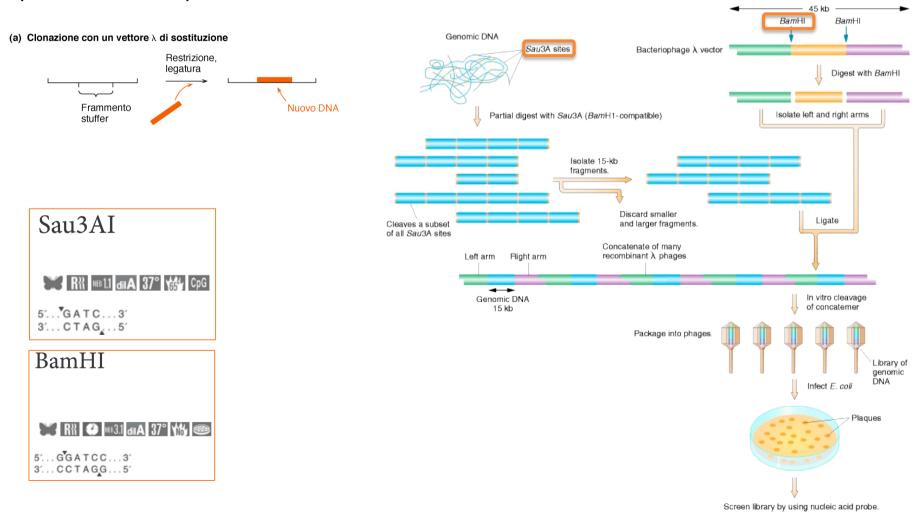


Inattivazione inserzionale del gene lacZ'

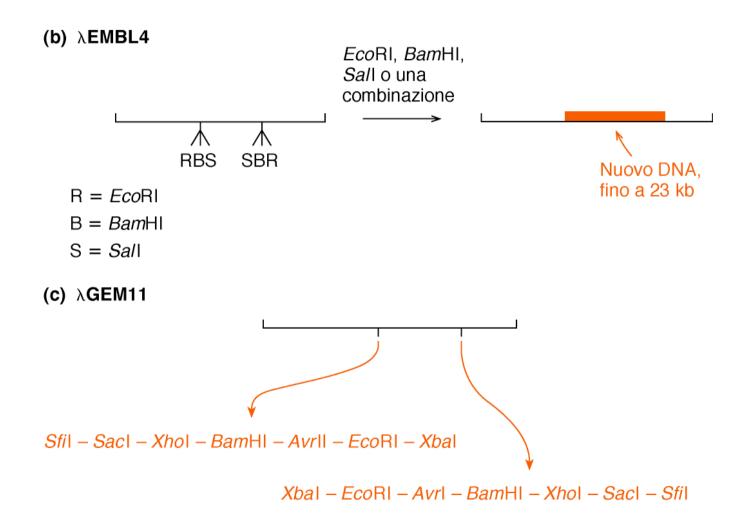


# Vettori di λ di sostituzione

Possiede due siti di riconoscimento che fiancheggiano un frammento di DNA (detto "stuffer") che viene sostituito dal DNA da clonare

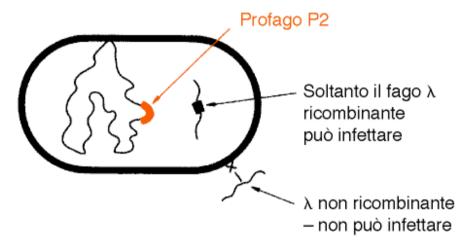


# Vettori di λ di sostituzione

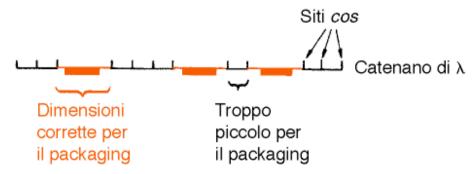


# Vettori di λ di sostituzione: identificazione di fagi ricombinanti

(c) Selezione mediante l'uso del fenotipo Spi



(d) Selezione in base alle dimensioni del genoma di  $\lambda$ 



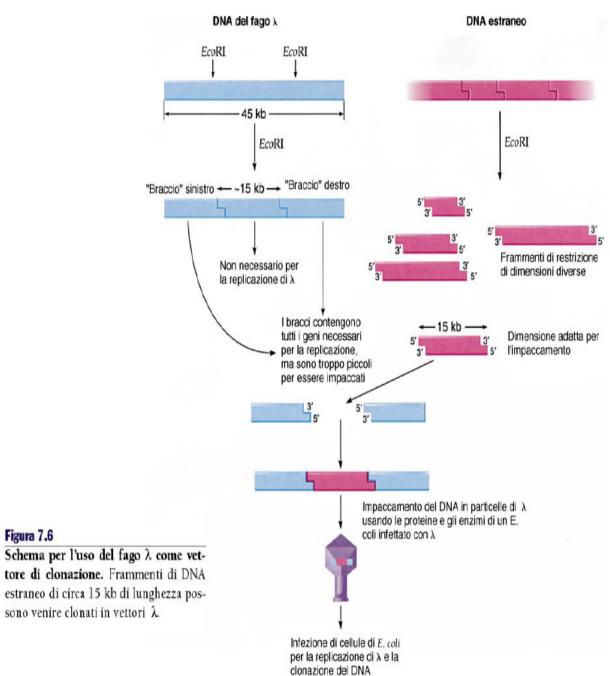


Figura 7.6 Schema per l'uso del fago \(\lambda\) come vettore di clonazione. Frammenti di DNA estraneo di circa 15 kb di lunghezza pos-

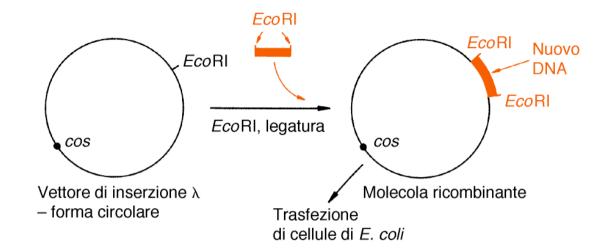
# Riassumendo

I **vettori di inserzione** sono indicati per il clonaggio di frammenti di DNA di medie dimensioni come ad esempio del cDNA (capacità massima 10 Kb).

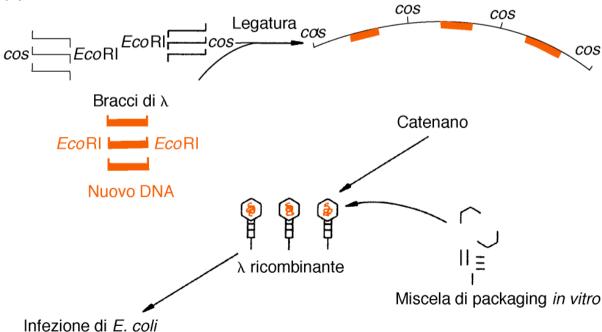
I **vettori di sostituzione** sono più adatti per il clonaggio di DNA genomico, perché accettano inserti fino ad un massimo di 23 Kb.

# Modalità di clonaggio con vettori λ

#### (a) Clonazione con DNA circolare di $\lambda$

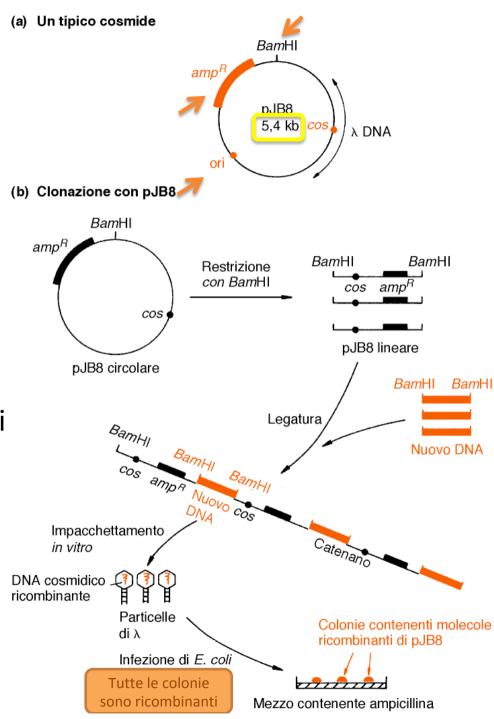


#### (b) Clonazione con DNA lineare di $\lambda$



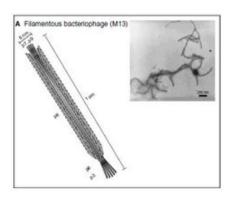
### Cosmidi

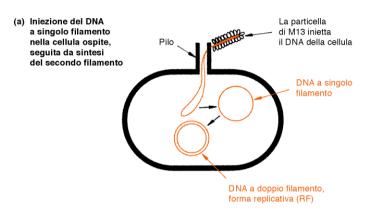
- Vettori ibridi ad elevata capacità (30-44 kb)
- derivati da λ (siti COS) e da plasmidi (gene di resistenza e origine di replicazione)
- Sono fondamentalmente dei plasmidi (non formano placche, ma colonie) ma il DNA viene impacchettato
- Selezione dei ricombinanti per dimensione

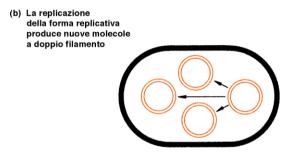


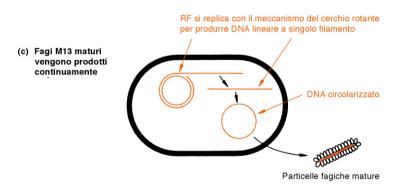
# Il batteriofago M13

- Membro della famiglia dei batteriofagi filamentosi.
- Genoma di 6407 bp a singolo filamento → meno geni.
- Nella forma replicativa M13 si replica come un plasmide fino a 100 copie per cellula.
- Fino a 1000 nuovi fagi (a singolo filamento) vengono prodotti con il meccanismo a cerchio rotante.



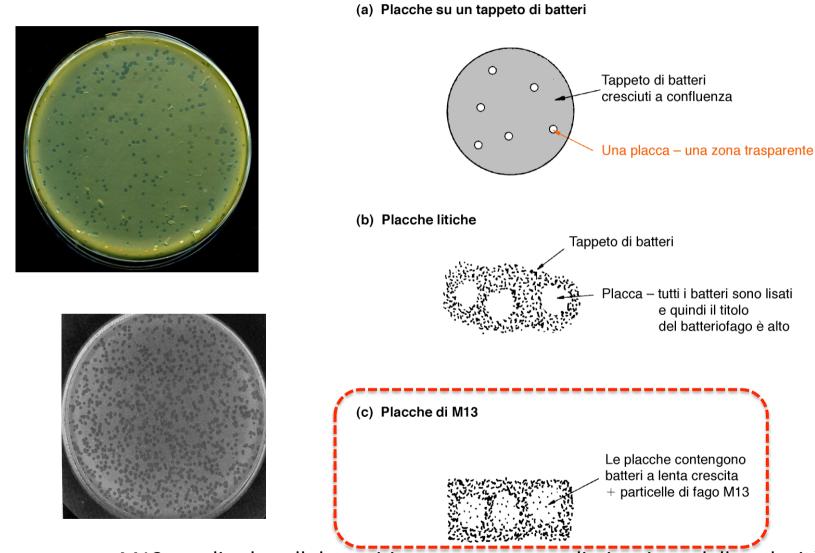






# Colonie e placche

L'infezione fagica si visualizza sotto forma di placche su un tappeto di batteri. Ciascuna placca corrisponde ad una zona chiara prodotta quando i fagi lisano le cellule.

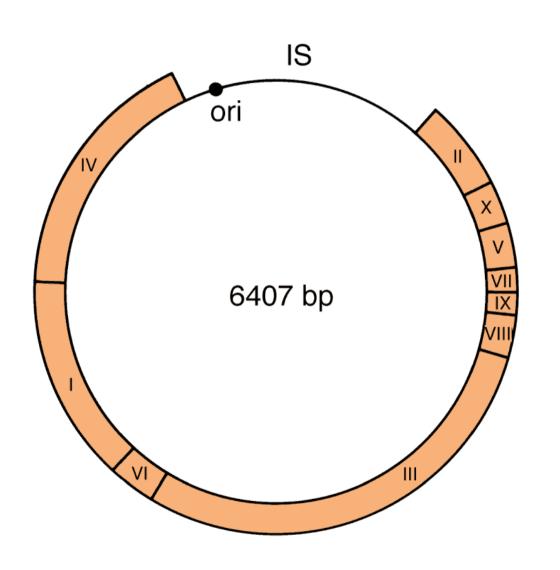


M13 non lisa le cellule ospiti, ma provoca una diminuzione della velocità di crescita delle cellule infettate

### M13 è stato utile per sviluppare vettori di clonaggio

- Il suo genoma è lungo meno di 10 Kb dimensioni auspicabile per un vettore
- La forma replicativa si comporta come un plasmide e come tale può essere trattato (preparazione, introduzione mediante trasfezione)
- I geni clonati possono essere ottenuti sotto forma di DNA a singolo filamento → sono utili per molte tecniche (sequenziamento del DNA, mutagenesi in vitro)

# Vettori basati sul batteriofago M13



I - X: geni essenziali per la replicazione e per il rivestimento proteico

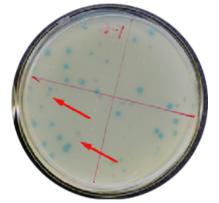
ori: Origine di replicazione

IS: Sequenza Intergenica,507 bp

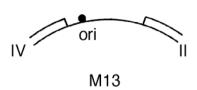
# Sviluppo dei vettori basati su M13

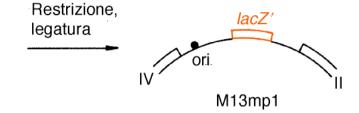
#### (a) Costruzione di M13mp1

#### Inserimento di LacZ'



Inserimento di un sito EcoRI in LacZ'





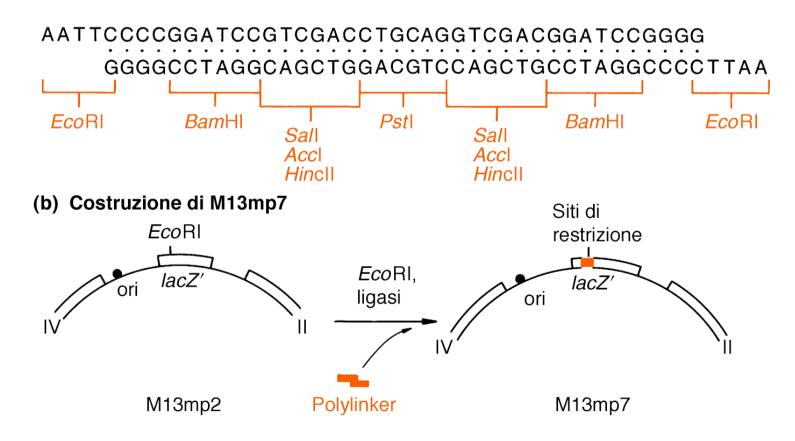
#### (b) Costruzione di M13mp2



### Sviluppo dei vettori basati su M13

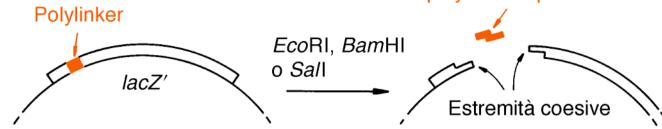
Introduzione del gene lacZ' nella sequenza intergenica Inserimento di un polilinker in LacZ'

(a) Il polylinker



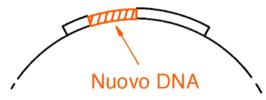
#### (a) Restrizione di M13mp7

Tutto il polylinker o parte di esso



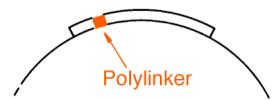
- (b) Legatura con nuovo DNA prodotti possibili
- (c) Colore delle placche su agar contenente X-gal

1 Si inserisce nuovo DNA



lacZ' interrotto  $\rightarrow$  Assenza di  $\beta$ -gal  $\rightarrow$  Placca chiara

2 Si reinserisce il polylinker



Si riforma  $lacZ' \rightarrow \beta$ -gal  $\rightarrow$  Placca blu

3 Non si inserisce nulla – legatura su se stesso



Si riforma  $lacZ' \rightarrow \beta$ -gal  $\rightarrow$  Placca blu

# Vettori ibridi plasmide M13 (fagemidi)

Limite di M13: 1500bp



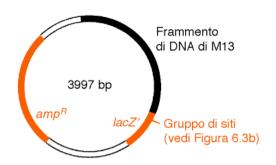
Sviluppo di **fagemidi**: capacità fino a 10Kb

Es: **pEMBL8** 

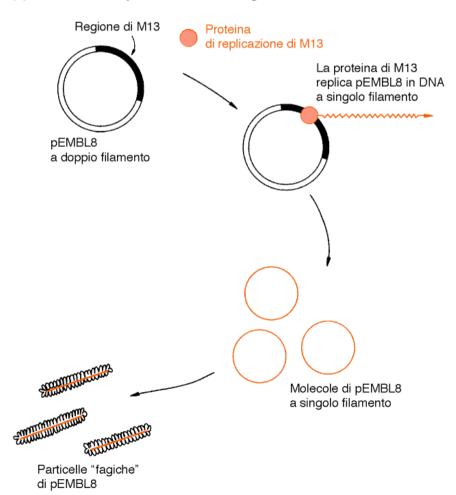
simile al vettore pUC8 + sequenza segnale di M13 (1300nt) per la conversione in DNA a singolo filamento prima della secrezione.

Le cellule di E.coli usate come ospite vengono infettate con un fago helper (M13 normale) in grado di fornire gli enzimi replicativi e le proteine di rivestimento necessarie.

#### (a) pEMBL8



#### (b) Conversione di pEMBL8 in DNA a singolo filamento



# Super-vettori: YAC, BAC e PAC

**YACs**: Yeast Artificial Chromosomes

**BACs**: Bacterial Artificial Chromosomes

**PACs**: P1 derived Artificial Chromosomes

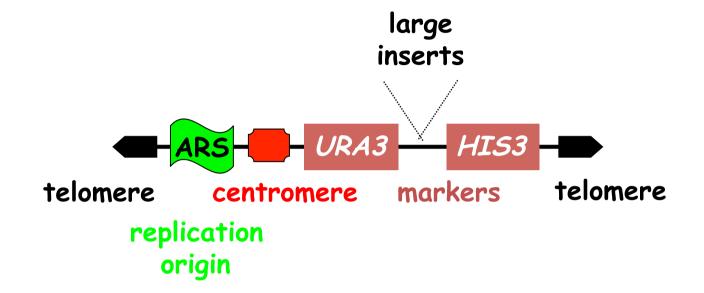
# Vantaggi:

- Utili per clonare frammenti di DNA molto grandi (100 Kb - 2000 Kb)
- Molto importanti per lo sviluppo dei progetti di sequenziamento genomico

# Svantaggi:

 Le grandi molecole di DNA possono non essere particolarmente semplici da manipolare

# YAC



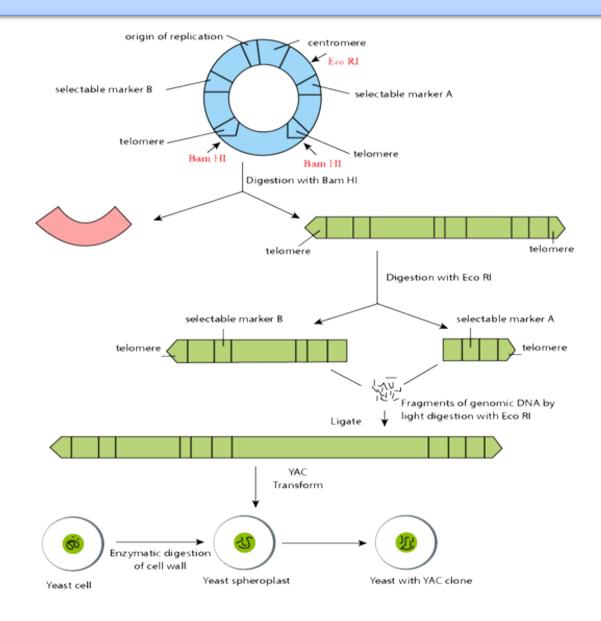
#### **PRO**

- Può contenere inserti fra 0,2 e 2 Mb in lievito→ non solo un gene, ma l'intero contesto genomico

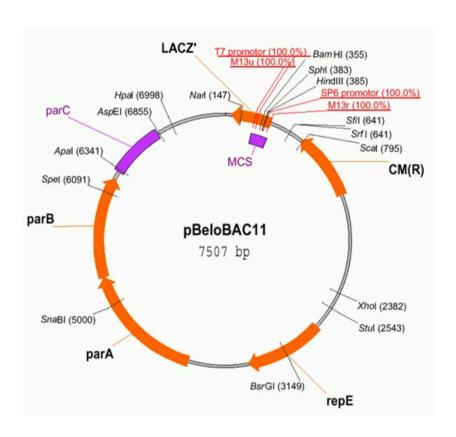
#### **CONTRO**

- Ridotta stabilità dell'inserto
- Ricombinanti difficili da recuperare e purificare

# **YAC**



# BAC



- Presente in 1-2 copie per cellula → I geni parA e parB mantengono I BAC in in singola copia
- I geni *ori*S e *ori*E mediano la replicazione
- Un marcatore di selezione che conferisce resistenza ad un antibiotico (CMR→ resistenza al cloramfenicolo)
- Il gene lacZ' contenente un MCS per il clonaggio dell'inserto che consenta lo screening bianco blu dei ricombinanti
- A causa delle loro dimensioni, la metodica utilizzata per inserire tali vettori nei batteri ospiti è la trasformazione per elettroporazione.

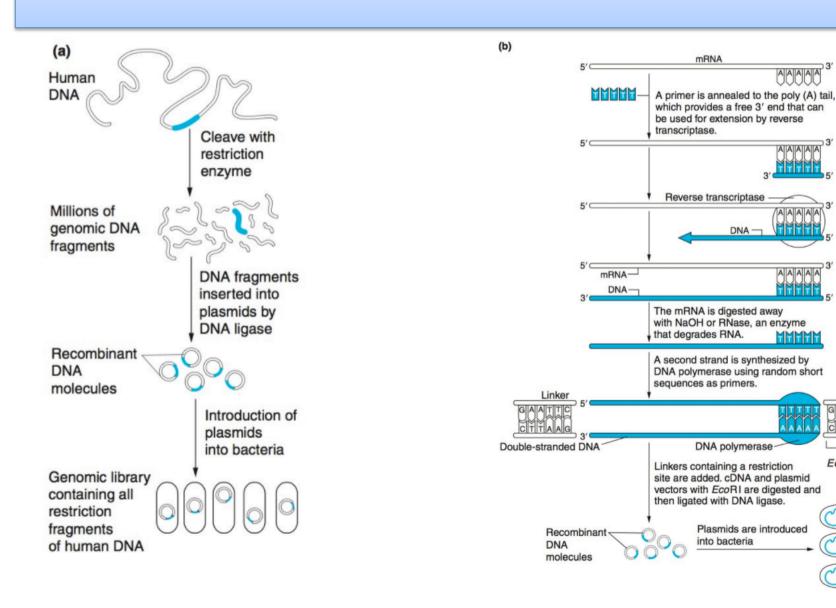
# Cosa determina la scelta di un vettore

- Dimensione dell'inserto
- Siti di restrizione
- Numero di copie
- Efficienza di clonaggio

different cloning vectors. YACs are discussed on p. 159.					
Vector	Host	Insert size			
λ phage	E. coli	5-25 kb			
λ cosmids	E. coli	35-45 kb			
P1 phage	E. coli	70-100 kb			
PACs	E. coli	100-300 kb			
BACs	E coli	≤ 300 kb			
YACs	Saccharomyces cerevisiae	200-2000 kb			

- Modalità di riconoscimento dei ricombinanti
- Che tipo di esperimento deve essere condotto?

# Genomic vs cDNA libraries

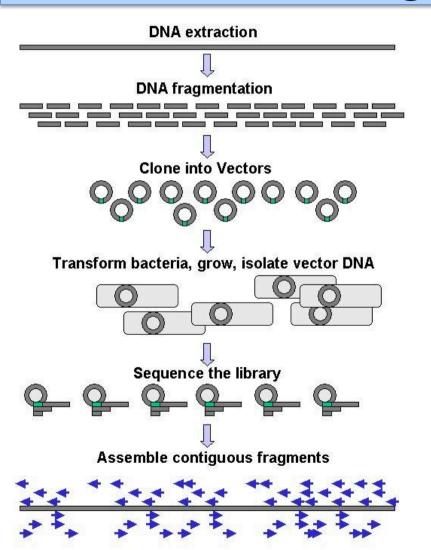


GIAIAITITI

CTTAA

EcoRI site

# Digestione parziale per la genesi di librerie genomiche



### Restrizione parziale

- PRO: si generano estremità facilmente ligabili
- CONTRO: alcune regioni del genoma possono essere scarsamente rappresentate

#### Frammentazione meccanica

- PRO: la frammentazione è realmente casuale
- CONTRO: è necessario uno step ulteriore per rendere le estremità ligabili

# Librerie genomiche

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-a/b)}$$

P = probabilità che la libreria contenga il frammento desiderato.

a = dimensione media dei frammenti di DNA inseriti nel vettore

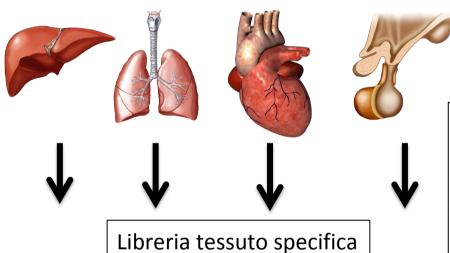
b = lunghezza totale del genoma

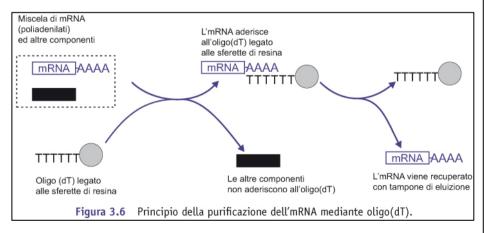
# Box 3.1 Stima delle dimensioni delle librerie genomiche in base al tipo di vettore utilizzato

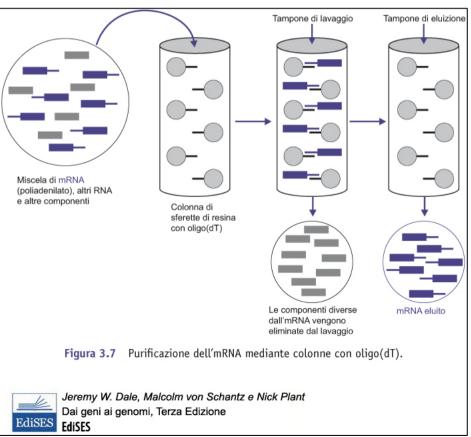
Organismo	Dimensione del genoma	Tipo di vettore	Dimensione dell'inserto	P	Dimensione della libreria
Batterio	$4 \times 10^6$ basi	Plasmide	4 kb	0.99	$4.6 \times 10^{3}$
		Lambda di sostituzione	18 kb	0.99	$1.0 \times 10^{3}$
		Cosmide	40 kb	0.99	458
		BAC	300 kb	0.99	59
Mammifero	$3 \times 10^9$ basi	Plasmide	4 kb	0.99	$3.5 \times 10^{6}$
		Lambda di sostituzione	18 kb	0.99	7.7 × 10 <sup>5</sup>
		Cosmide	40 kb	0.99	$3.5 \times 10^{5}$
		BAC	300kb	0.99	$4.6 \times 10^{4}$

I valori relativi alle dimensioni del genoma batterico e di mammifero sono solo esempi utilizzati ai fini del calcolo. Le dimensioni effettive del genoma variano notevolmente da un organismo all'altro. Sono variabili anche le dimensioni dell'inserto per gli specifici vettori. P è la probabilità che la libreria contenga il frammento di DNA desiderato.

# **Purificare I'mRNA**



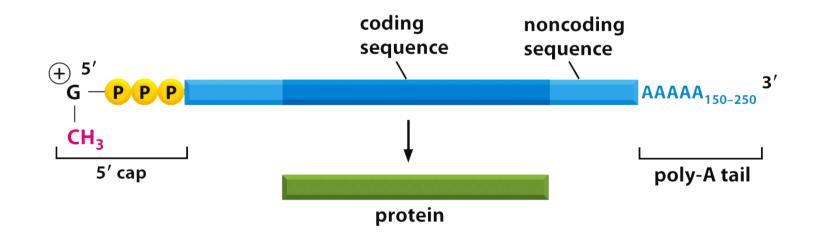




# Si può clonare l'RNA direttamente?

 Non direttamente — la DNA polimerasi richiede un DNA come templato e non è in grado di copiare l'RNA.

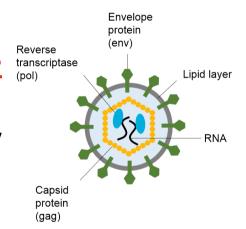
• L'RNA deve prima essere copiato a cDNA usando una trascrittasi inversa.



# Retrotrascrizione

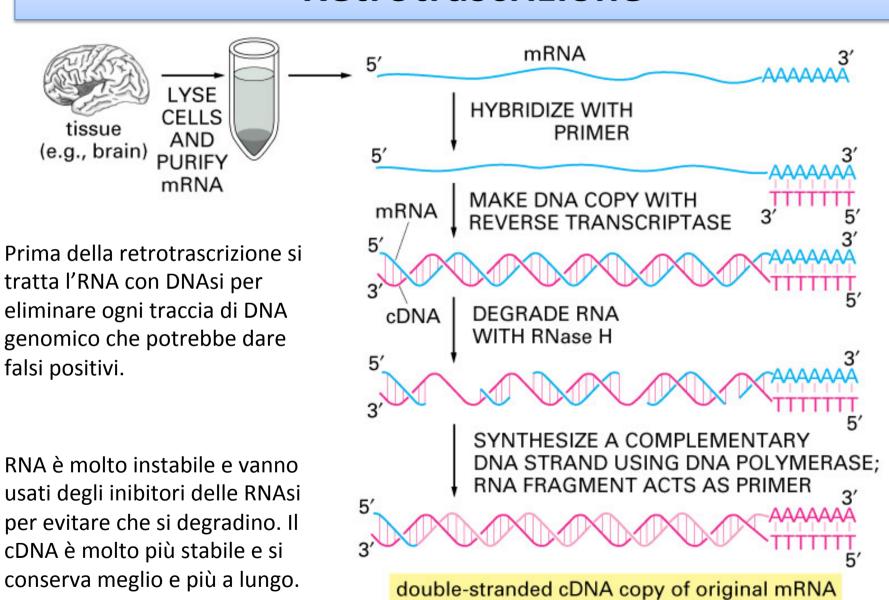
Per RT si intende <u>Reverse transcription</u> su templato di RNA per la produzione di una molecola di cDNA (DNA complementare ad un RNA messaggero)

A questo scopo si utilizzano <u>Reverse Transcriptase</u> (<u>RT</u>) enzimi che derivano dai retrovirus eucariotici, AMV avian myeloblastosis virus, M-MuLV Moloney leukemia virus murino.

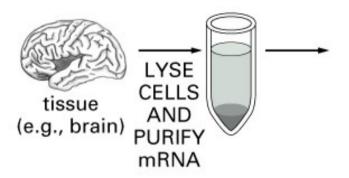


Tale enzima non è termoresistente, ma recentemente sono state isolate e clonate delle RT mutanti che resistono a temperature fino a 60°C.

# Retrotrascrizione

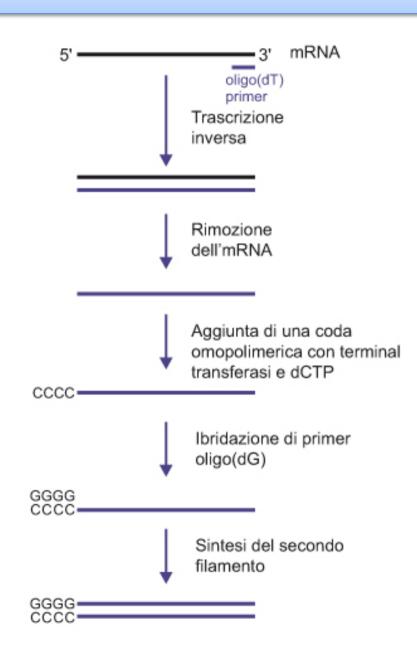


# Retrotrascrizione

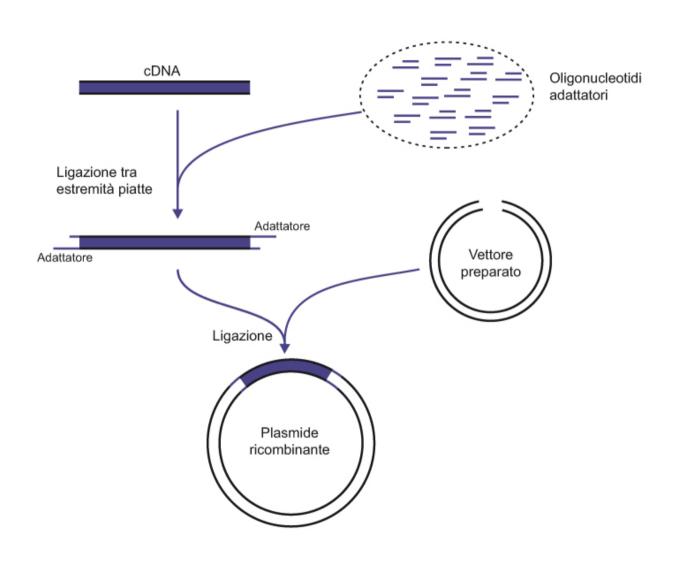


Prima della retrotrascrizione si tratta l'RNA con DNAsi per eliminare ogni traccia di DNA genomico che potrebbe dare falsi positivi.

RNA è molto instabile e vanno usati degli inibitori delle RNAsi per evitare che si degradino. Il cDNA è molto più stabile e si conserva meglio e più a lungo.



# Clonaggio del cDNA



# Screening di librerie

