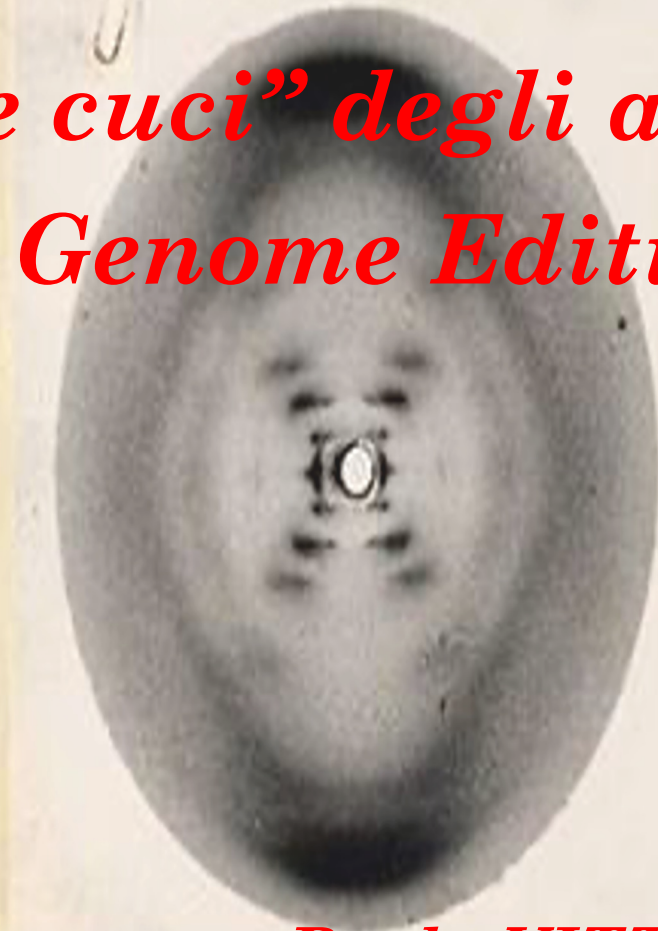


*Metodologie del DNA ricombinante
ovvero.....*

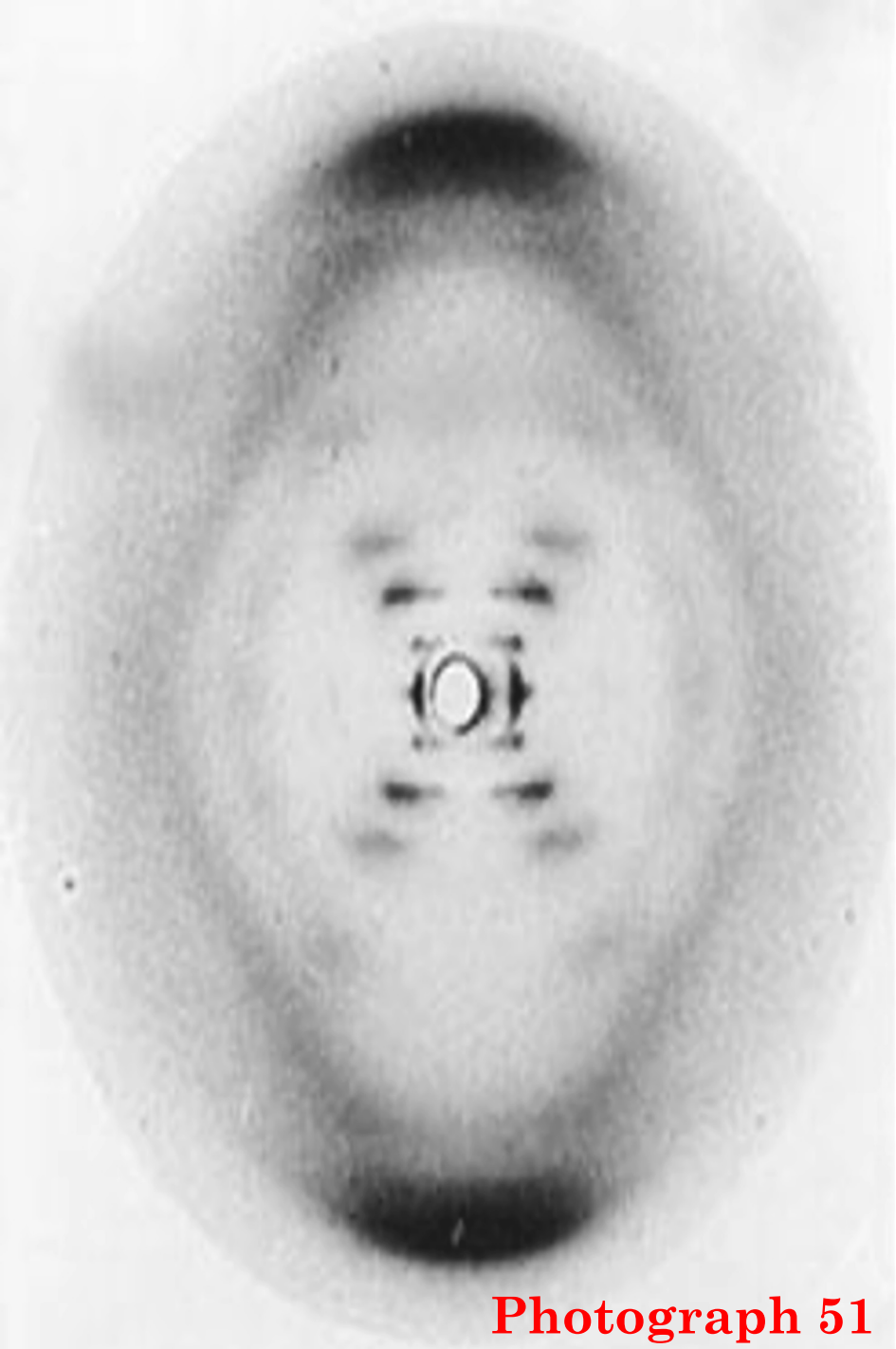
*dal “taglia e cuci” degli acidi nucleici
al Genome Editing*



Franklin &
Gosling
DNA structure
Type I

Paola VITTORIOSO, PhD

Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin



Photograph 51



Lezione:

CU008

Lunedì 14-16

Mercoledì 14-16

Venerdì 16-18

NO Lezione:

29/3, 1/4 Pasqua

26 Aprile

1 Maggio

ESAMI

3 Giugno

1 Luglio

22 Luglio

2 Settembre

11 Novembre

13 Gennaio 2025

Modalità d'esame:

Presentazione di un articolo.....

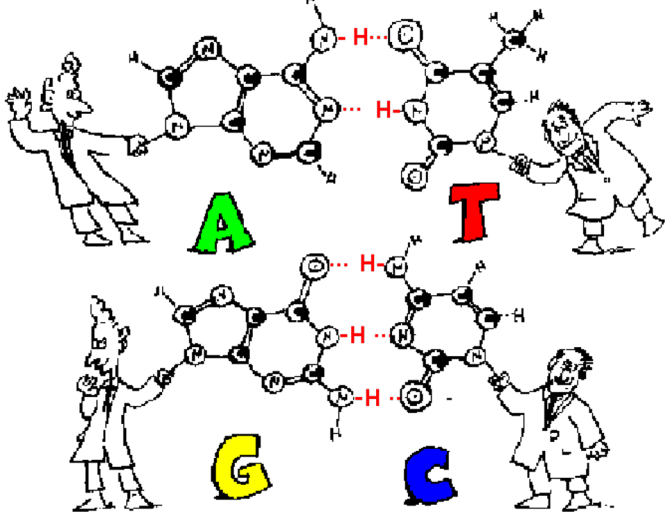
Solo per studenti “frequentanti”

- Problematica biologica
- Che domande si pongono gli Autori
- Quali strategie/tecniche utilizzano

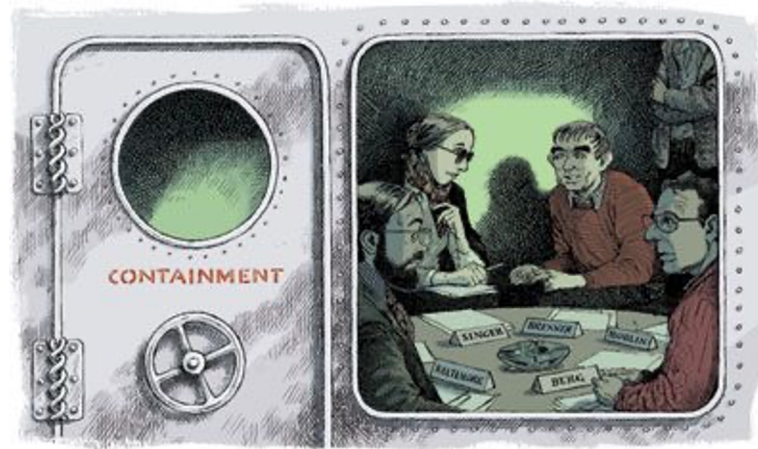
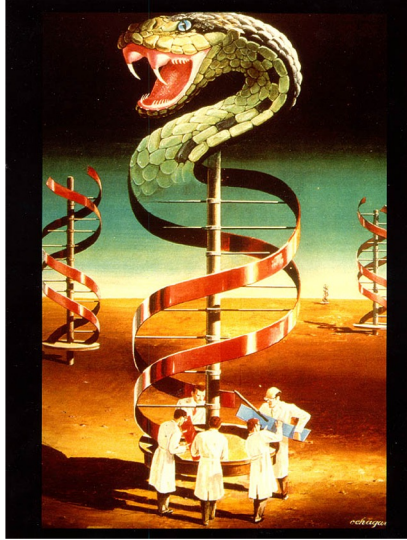
Commenti/Critiche

Orale

- **Introduzione all'ingegneria genetica**
 - **Tecniche di base di B.M.**
 - **Clonaggio, tecniche e strategie, PCR,**
- **Analisi d'espressione I: Real TimeR. MATTIOLI (Sapienza)**
 - **Tecniche di Mutagenesi**
 - **Interazione proteina-proteina**
- **Analisi d'espressione II: Microarray R. MATTIOLI (Sapienza)**
- **Sequenziamento del DNA-NGS S. GABRIELE (Agilent Tech.)**
 - **Espressione eterologa**
 - **Interazione DNA-proteine**
 - **Ch-IP, ChIP on ChIP, ChIP Seq**
 - **RIP, CLIP, ChIRP, etc...**
- **Tipizzazione del DNA-DNA Fingerprinting**
- **Genetica For/Rev, RNAi, Tilling, Talen, CRISP-Cas9**
 - **Chemical Genetics A.LEPRI (Sapienza)**
- **Trasformazione di cellule animali, di cellule vegetali**
 - **OGM**
 - **Biosensori H.KAZMI (Sapienza)**
- **Analisi e discussione tecnica di articoli C.LONGO (Sapienza)**



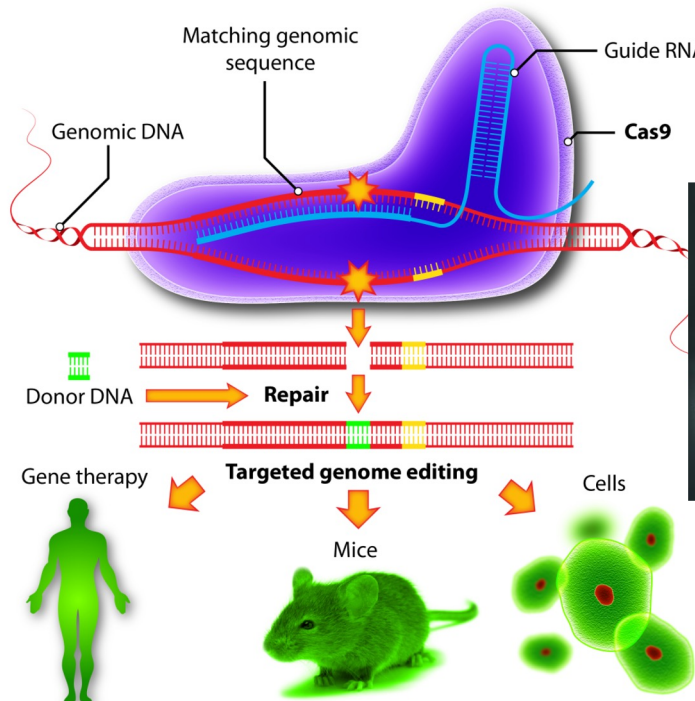
DNA structure 1953



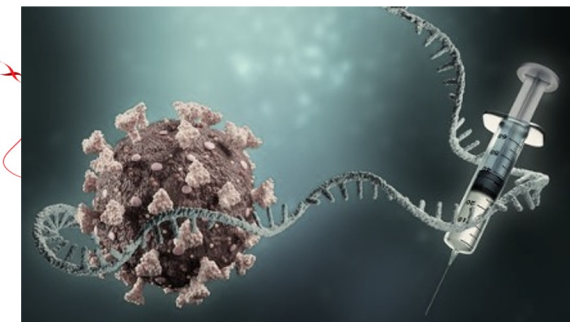
1973 - 1° Asilomar conference
Principi etici e rischi....



Human Genome Project
1990/2003



The CRISPR/Cas system
2010



mRNA Vaccines
Anti Sars-Cov2

La rivoluzione

Il trasferimento di un'unità ereditaria funzionale (un gene) da un organismo all'altro si basava sulla strategia elaborata da S. Cohen e da H. Boyer nel 1973.

delle biotecnologie ricombinanti

[Info for Authors](#) | [Editorial Board](#) | [About](#) | [Subscribe](#) | [Advertise](#) | [Contact](#) | [Site Map](#)

PNAS

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

[Current Issue](#)

[Archives](#)

[Online Submission](#)

GO

[advanced search >>](#)

Institution: [ACIDI NUCLE CR](#) [Sign In as Member / Individual](#)

[◀ Previous Article](#) | [Table of Contents](#) | [Next Article ▶](#)

PNAS | November 1, 1973 | vol. 70 | no. 11 | 3240-3244
Copyright © 1973 by the National Academy of Sciences

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro

Stanley N. Cohen, Annie C. Y. Chang, Herbert W. Boyer, and Robert B. Helling

The construction of new plasmid DNA species by in vitro joining of restriction endonuclease-generated fragments of separate plasmids is described. Newly constructed plasmids that are inserted into *Escherichia coli* by transformation are shown to be biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences from both of the parent DNA molecules. Functional plasmids can be obtained by reassociation of endonuclease-generated fragments of larger replicons, as well as by joining of plasmid DNA molecules of entirely different origins.

“Si potrebbe riuscire ad introdurre nel batterio *E.coli* geni che specificano funzioni metaboliche o di sintesi quali la fotosintesi o la produzione di antibiotici di altre classi biologiche”

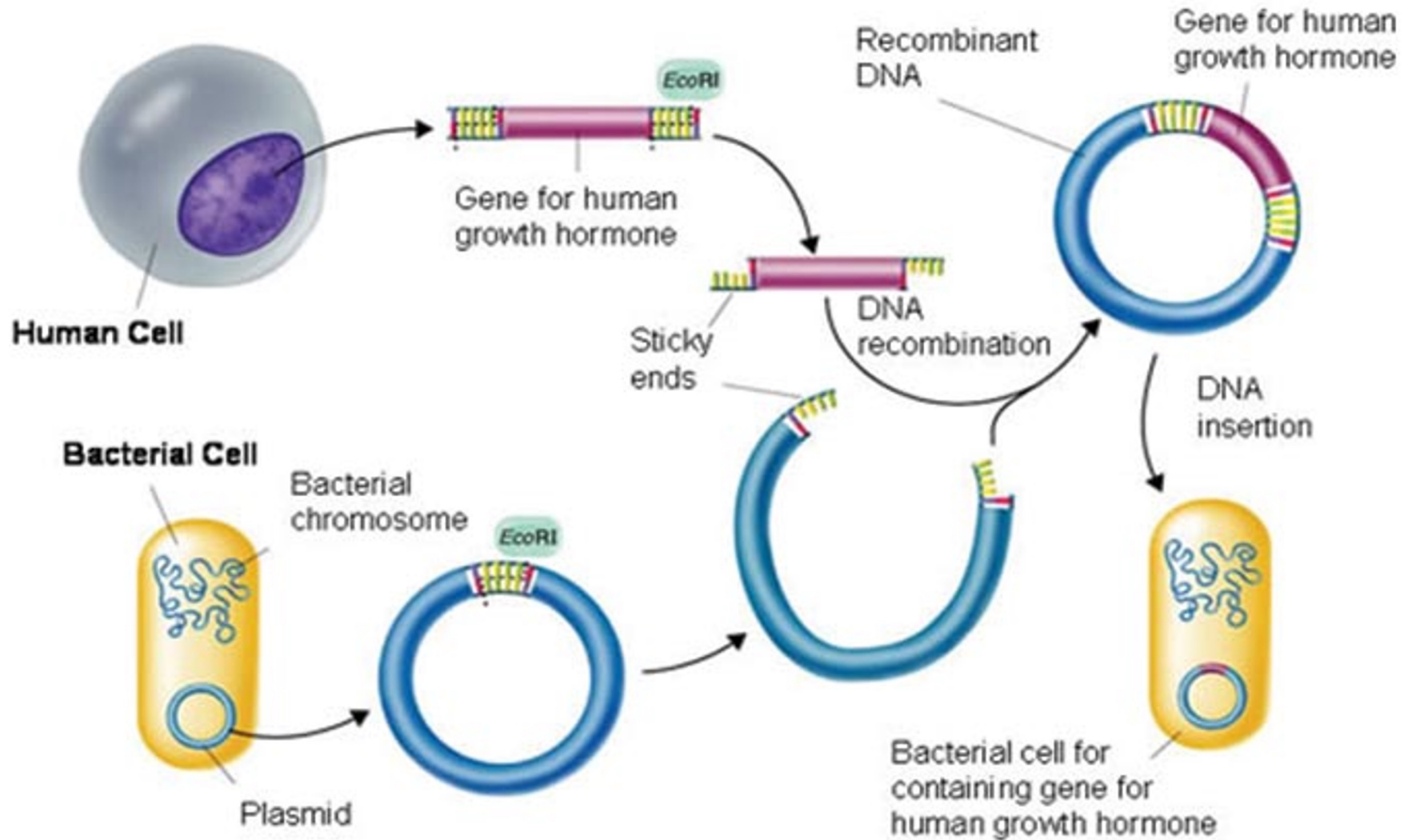
Il clonaggio molecolare

Clonaggio riproduzione di organismi geneticamente uguali mediante la mitosi, o riproduzione asessuata. Per esempio la riproduzione dei batteri è di tipo clonale.

Sebbene animali e piante normalmente si riproducano per meiosi (riproduzione sessuata), è possibile clonare organismi superiori.

- il **clonaggio (o clonazione)** di organismi superiori (**Dolly**): creazione di individui geneticamente uguali senza alcuna modifica genetica
- il **clonaggio molecolare (mais transgenico)**: i geni vengono manipolati ed introdotti in organismi ospiti, arrivando infine alla creazione di organismi geneticamente modificati (**OGM**)

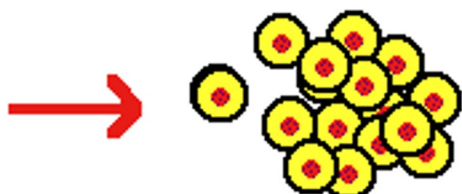
Molecular Cloning



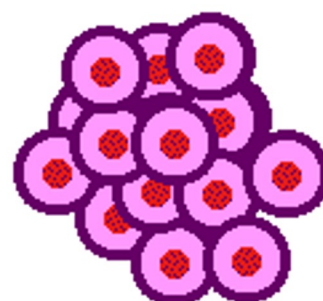
Somatic Cloning



Organism to be cloned



Developed differentiated cells taken from the organism. They have been starved of nutrients so that they don't begin to copy their chromosomes. They copy their chromosomes right before the cells reproduce themselves. Two copies of chromosomes can cause defects in the organism.

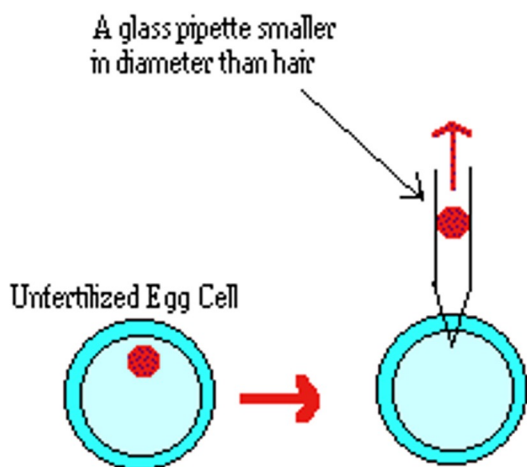


Begins to develop as an embryo



Egg cell and cell to be cloned, are fused together

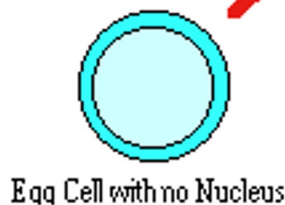
Implanted into a ewe



Unfertilized Egg Cell

A glass pipette smaller in diameter than hair

Nucleus removed from egg cell



Egg Cell with no Nucleus



Clone is born

Isolamento e Purificazione di Acidi Nucleici

Il primo passo di qualunque tecnica di biologia molecolare consiste nell'isolare e purificare gli acidi nucleici. I dettagli sperimentali variano a seconda degli organismi, del tipo di acido nucleico che si vuole separare, del tipo di esperimento che si deve effettuare, ecc. In few words.....

- Rompere la parete e/o la membrana cellulare
- Separare gli acidi nucleici da altri componenti cellulari
- Separare gli acidi nucleici tra loro (DNA v/s RNA)

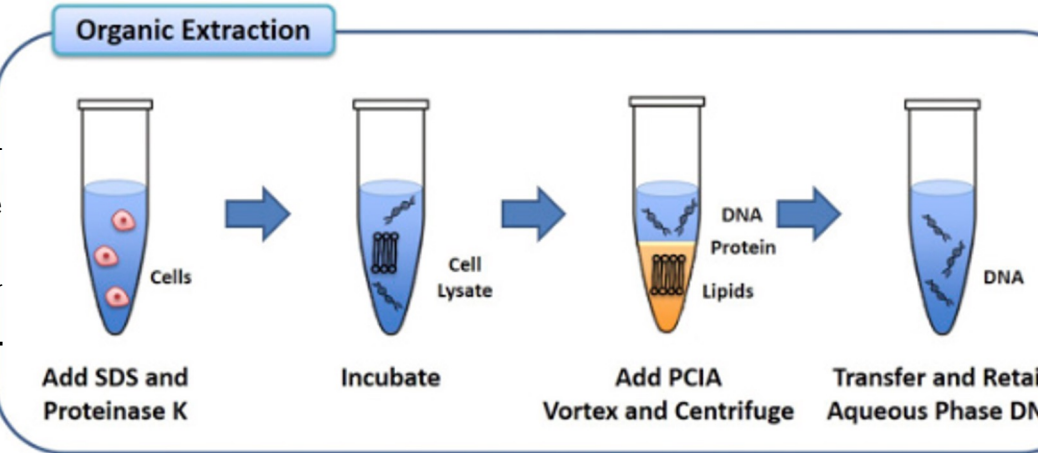
Qualunque tipo cellulare contiene acidi nucleici,

Ma.....

**DNA uguale in TUTTE le cellule,
mRNA specifico per ogni tipo cellulare**

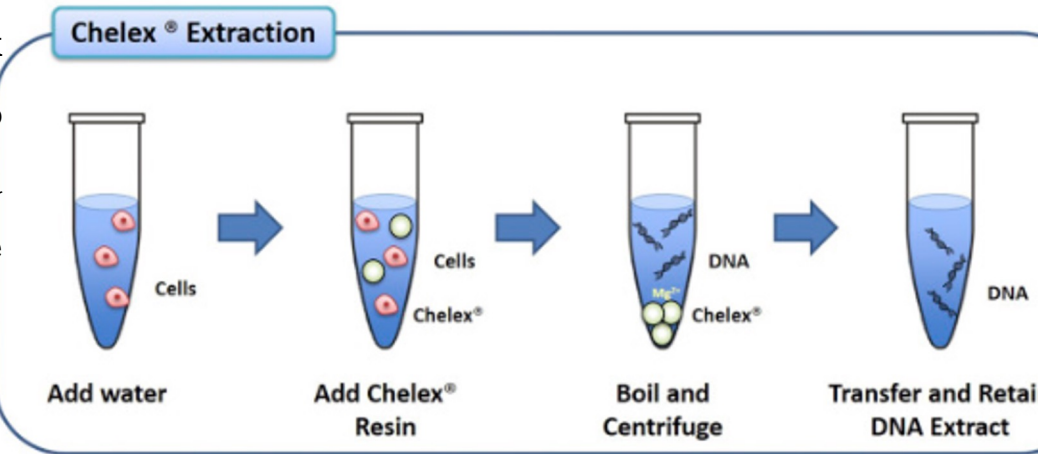
Organic Extraction

Si usa fenolo: cloroformio: alcool isoamilico per separare il DNA nella fase acquosa e lipidi e proteine ripartiti nella fase organica o nell'interfaccia acquosa-organica



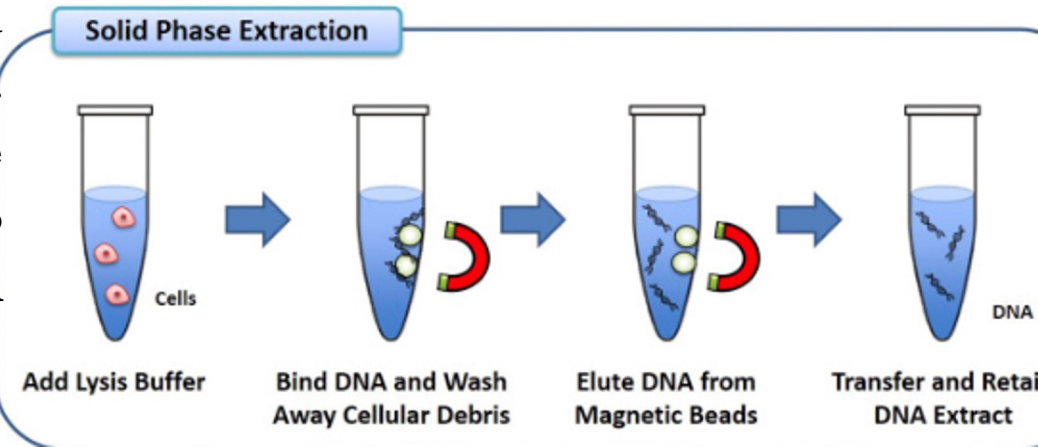
Chelex Extraction

Lisi ad alta T in ambiente basico, Chelex resina che chela ioni Mg, inattivando eventuali Dnasi. Dopo centrifuga, nella sospensione acquosa si trova il DNA (e l'RNA)



Solid Phase Extraction

il DNA è legato selettivamente a un supporto solido come la silice in presenza di soluzioni ad alto contenuto salino. Accoppiando la silice alle particelle paramagnetiche, i magneti possono essere utilizzati per immobilizzare il DNA lavando via altri componenti cellulari.



Organic Extraction

Fenolo

- E' un forte denaturante delle proteine che le lega mediante legami H, alterandone la struttura.
- Le proteine denaturate, con i gruppi idrofobici esposti, diventano solubili nella fase fenolica o precipitano all'interfase fenolo-acqua.
- E' un solvente dei lipidi e delle molecole di RNA contenenti lunghi tratti di poli(A)

Cloroformio

- completa la denaturazione delle proteine
- rimuove i lipidi
- grazie alla sua elevata densità facilita la separazione della fase acquosa (contenente il DNA deproteinizzato) da quella organica (fenolica) stabilizzando l'interfaccia tra le due fasi.

Alcol isoamilico

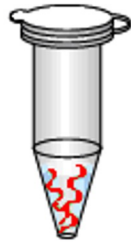
- riduce la schiuma che si forma nel corso dell'estrazione.

Genomic DNA Isolation

Sample Preparation



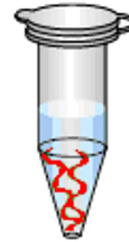
Cell Lysis



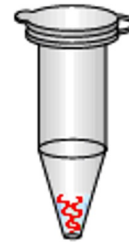
Protein Removal



DNA Precipitation



DNA Rehydration



DNA Purification

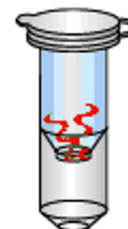
Sample Preparation



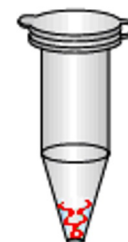
DNA Binding



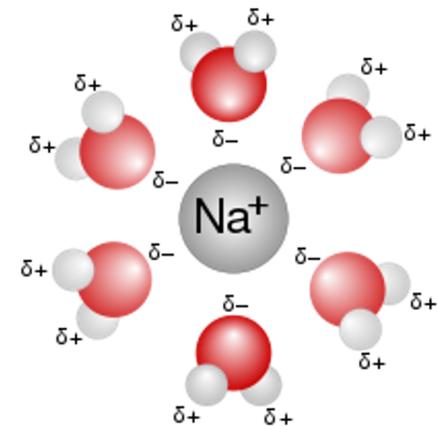
Wash



DNA Elution



If enough ethanol is added, the electrical attraction between phosphate groups and any positive ions present in solution becomes strong enough to form stable ionic bonds and DNA precipitation.



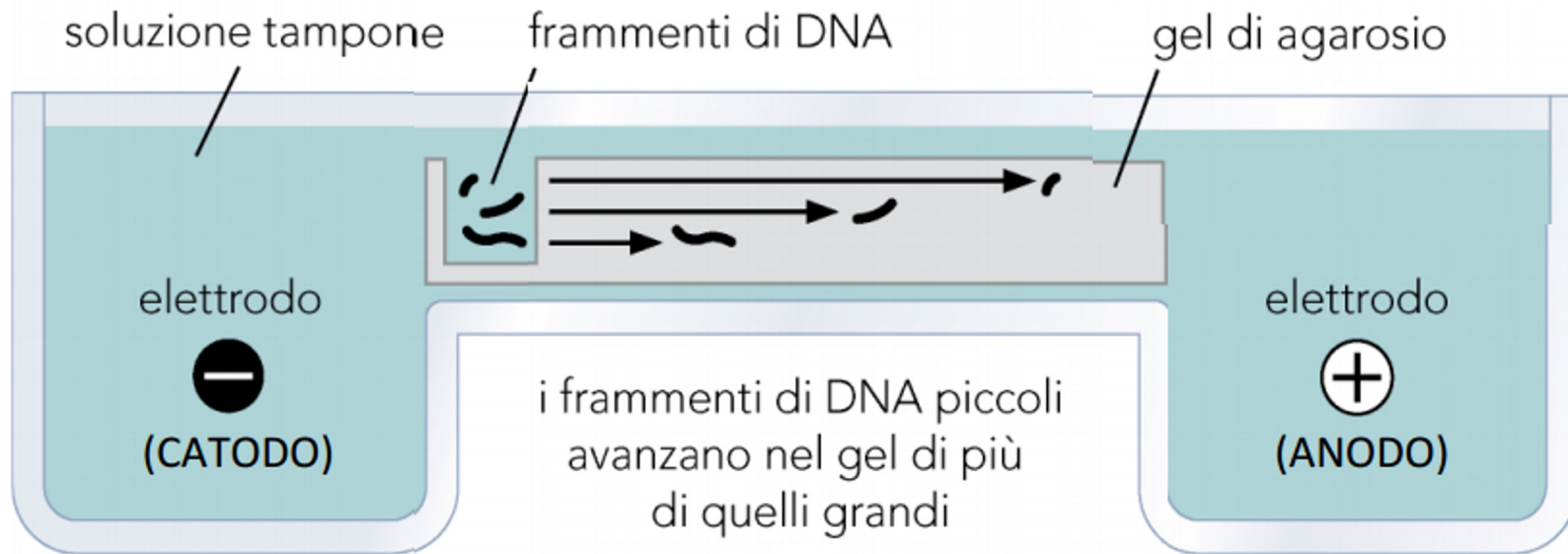
Tecnica	Applicazione
Metodi non meccanici	
Shock osmotico	Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
Congelamento/scongelamento	Tessuti animali molli, alcuni batteri
Enzimi litici	Cellule animali e vegetali
Soluzioni con Detergenti (NP40, SDS)	Cellule in coltura, batteri
Metodi meccanici	
Pestello e mortaio	Tessuti resistenti
Sfere di vetro	Batteri e funghi
Omogenizzatore a motore	Tessuti vegetali e animali
Omogenizzatore a mano	Tessuti molli delicati
Estrusione solida (Hughes press)	Materiale vegetale resistente
Estrusione liquida (French press)	Microorganismi
Ultrasonificazione	Microorganismi

DNasi v/s RNasi

- **Le DNasi richiedono ioni metallici per la loro attività e sono termolabili, per cui sono facilmente inattivate da agenti chelanti e dalla sterilizzazione in autoclave**
- **Le RNasi non hanno bisogno di cofattori, resistono a trattamenti drastici (ebollizione prolungata, sterilizzazione in autoclave) e sono attive entro un ampio range di pH.**

camera di elettroforesi

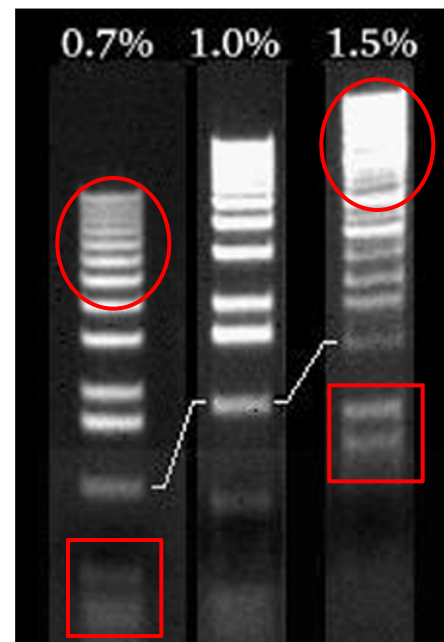
Si b
gene
Poic
neut
Le n



trico
ente.
pone

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

Table 1: Correct Agarose Gel Concentration for Resolving DNA Fragments

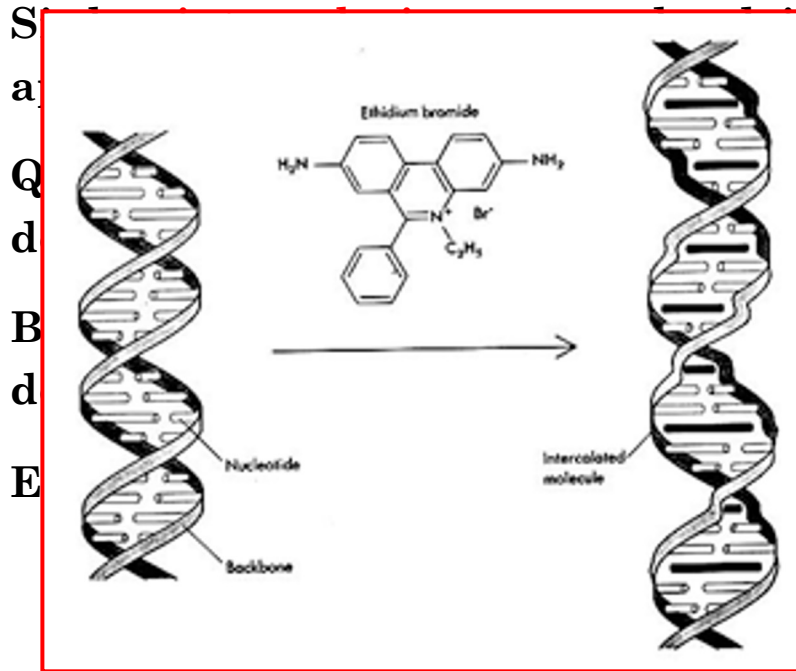


Il gel di Agarosio è una matrice tridimensionale formata da molecole di agarosio elicoidali strutturate in fasci superavvolti, raggruppati in strutture tridimensionali formanti canali e pori attraverso i quali possono passare delle biomolecole. La struttura 3-D è tenuta insieme da legami idrogeno e può quindi essere interrotta mediante riscaldamento del gel, riportandolo allo stato liquido. La temperatura di fusione è diversa dalla temperatura di gelificazione, il gel di agarosio ha una T di gelificazione di 35-42 °C e una di fusione di 85-95 °C.

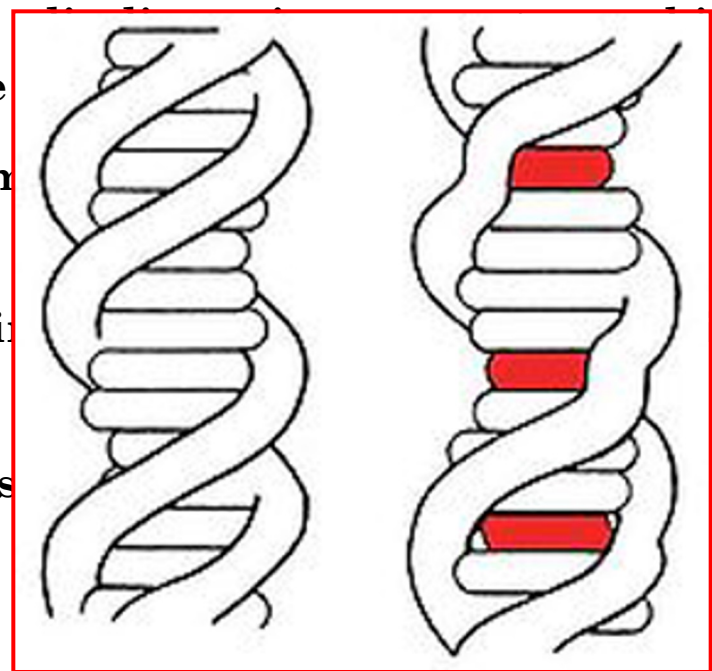
Il gel di poliacrilammide (PAGE) è utilizzato per separare solitamente proteine o acidi nucleici ad alta risoluzione, in base alla loro mobilità elettroforetica.

Le molecole possono essere fatte migrare nel loro stato nativo, preservando la struttura di ordine superiore delle molecole, oppure è possibile aggiungere un denaturante chimico per trasformare la molecola in una catena lineare non strutturata la cui mobilità dipende solo dalla lunghezza e dal rapporto massa/carica. Per gli acidi nucleici, l'urea è il denaturante comunemente usato. Per le proteine, il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico usato per linearizzare le proteine e impartire una carica negativa alle proteine linearizzate, (SDS-PAGE).

Bromuro d'etidio: un intercalante del DNA



ligandi
le coppie
lici, aron
le basi i
ne nel vis



mica
sono
van

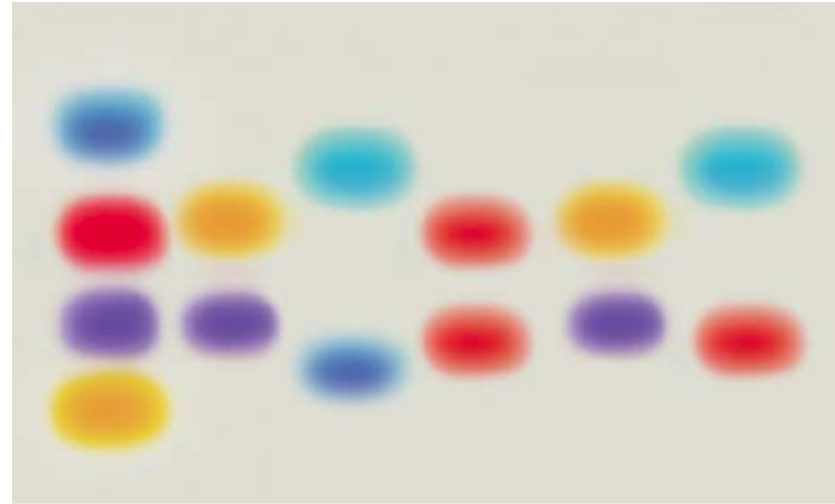
L'intercalazione induce distorsioni strutturali.

Queste **modificazioni strutturali** possono portare a **modificazioni funzionali**, spesso l'inibizione della trascrizione e della replicazione o del riparo del DNA, il che rende gli intercalanti potenti **mutageni**.

Come seguiamo la migrazione del DNA/RNA nel gel????

Il buffer di caricamento contiene anche un composto denso, come il glicerolo, saccarosio, o Ficoll, che aumentano la densità del campione, in modo che il campione di DNA può depositarsi sul fondo del pozzetto. Se il campione di DNA contiene etanolo residuo dall'estrazione, ne può causare la fuoriuscita dal pozzetto per galleggiamento.

Poiché il DNA non è visibile alla luce naturale, l'avanzamento della elettroforesi del campione è controllata mediante l'aggiunta di coloranti, come **Xilene cianolo**, **Cresol Red**, **Orange G**, e il **blu di bromofenolo** utilizzati per monitorare l'andamento della elettroforesi. Xilene cianolo (colore azzurro) co-migra con grandi frammenti di DNA, mentre il blu di bromofenolo (blu scuro) co-migra con i frammenti più piccoli.



Separazione del DNA plasmidico

Il movimento del DNA è influenzato dalla conformazione della molecola di DNA, per esempio, DNA superavvolto di solito si muove più velocemente di DNA «rilassato», perché è strettamente avvolto e quindi più compatto. In una normale preparazione di DNA

DNA.

L'elettroforesi su gel di agarosio mostra come la banda principale

(«lineare») e la forma circolare

La velocità con cui le

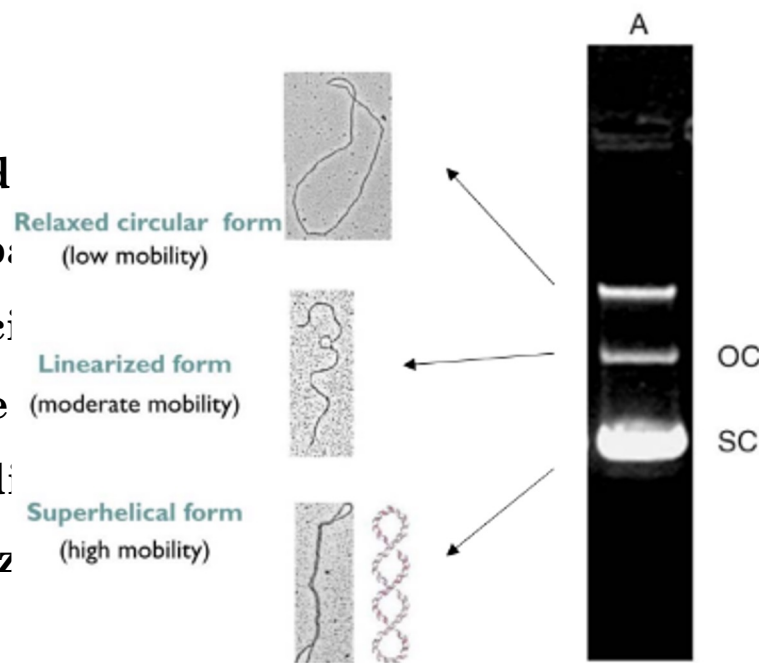
differenti condizioni di

maggiormente influenzate

gel.

L'etidio bromuro può cambiare la carica, la lunghezza, così come la superhelicity della molecola di DNA, quindi la sua presenza nel gel durante l'elettroforesi ne può influenzare il movimento.

L'elettroforesi in gel di agarosio può essere utilizzata per analizzare il DNA circolare con diversa tipologia di avvolgimento.



Le diverse forme di

la forma «superavvolta»

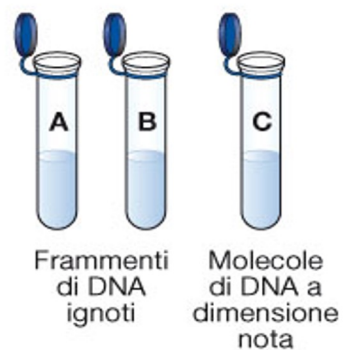
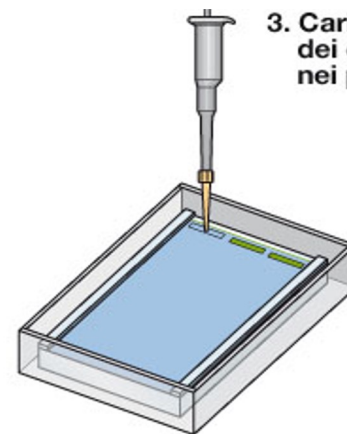
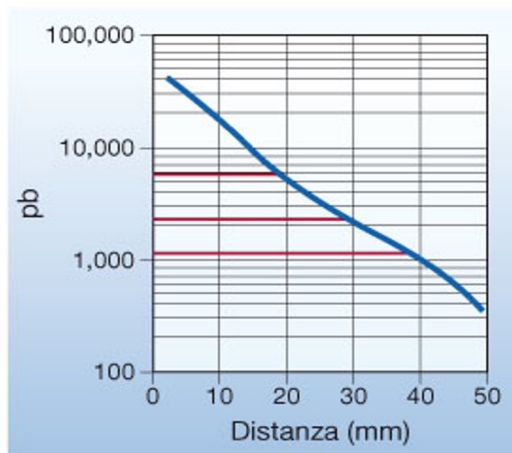
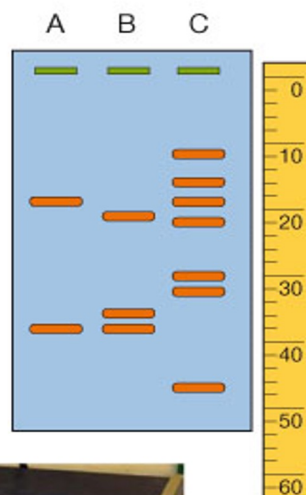
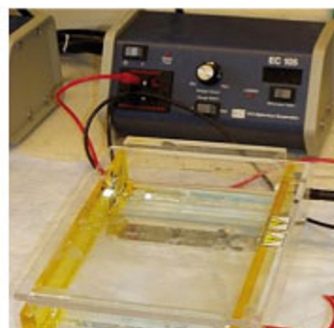
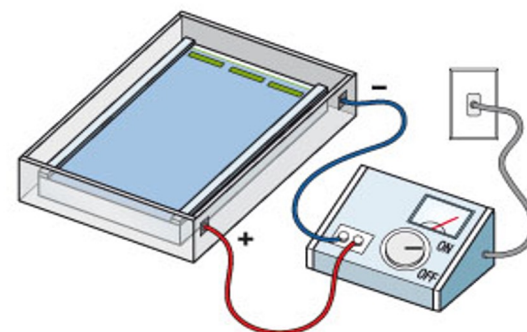
forma circolare aperta

non come bande minori.

La mobilità può cambiare usando

La mobilità di un DNA circolare può essere

influenzata dalla dimensione dei pori del

A**1. Preparazione del gel****2. Campioni di DNA da analizzare****3. Caricamento dei campioni di DNA nei pozzetti del gel****6. Determinazione della curva standard per determinare le dimensioni di frammenti di DNA****5. Colorazione delle molecole di DNA con bromuro di etidio e misurazione della distanza percorsa dal pozzetto****4. Separazione dei frammenti di DNA tramite elettroforesi**

Applicazioni

Separazione di frammenti di DNA per l'estrazione e purificazione

L'analisi dei prodotti di PCR (in diagnosi genetica molecolare o fingerprinting genetico)

Stima della dimensione delle molecole di DNA tagliati con enzimi di restrizione (presenti nella mappatura di restrizione del vettore di clonaggio del DNA)

Southern blotting o Northern blotting (trasferimento di RNA)

Trasferimento su membrana ed ibridazione

- **Southern blotting**

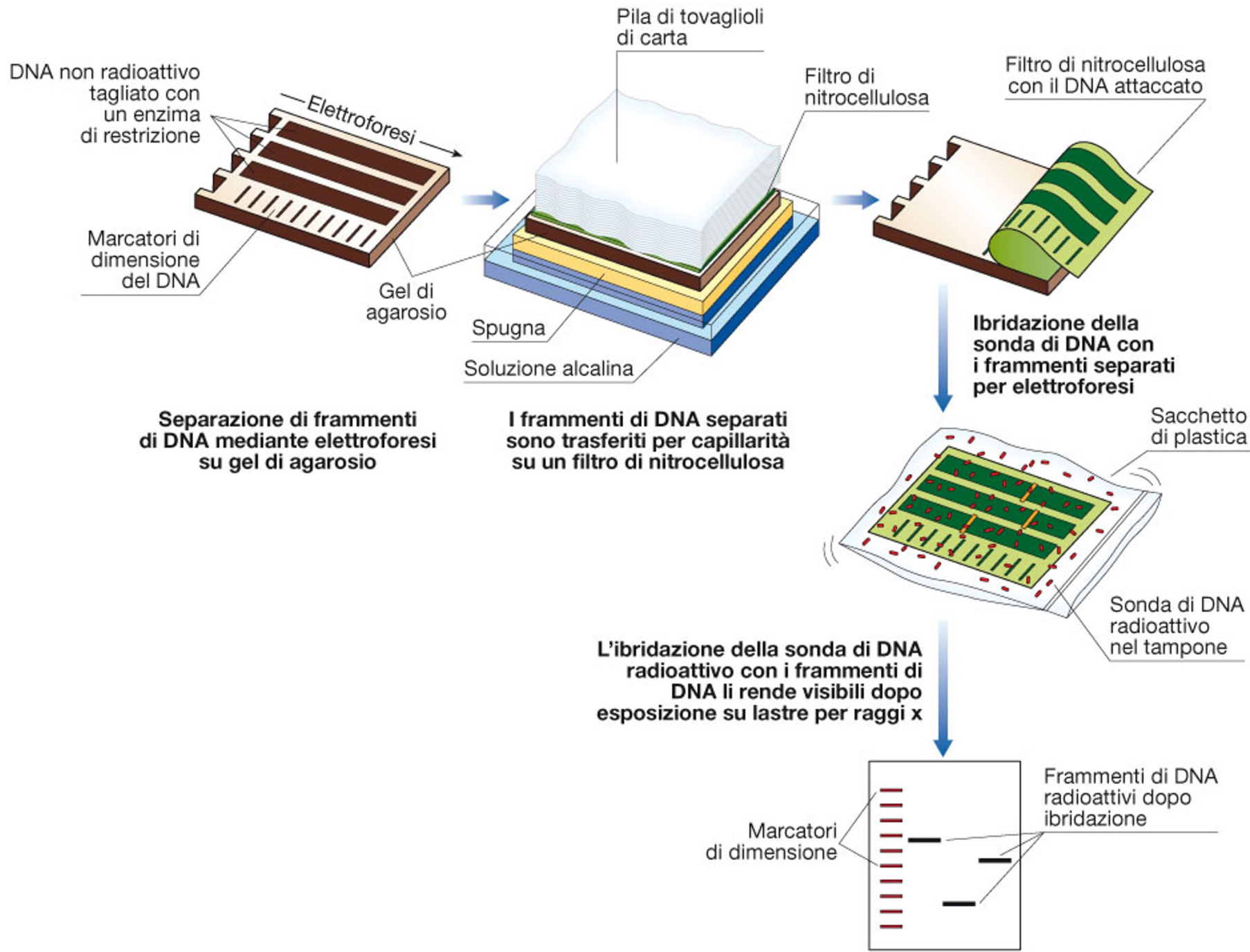
Messo a punto da Southern al fine di determinare la presenza, in una miscela eterogenea di frammenti di DNA separati in gel d'agarosio, di frammenti complementari a specifiche sequenze di DNA.

- **Northern blotting**

La procedura prevede il trasferimento di frammenti di RNA da un gel d'agarosio su membrana di nitrocellulosa/nylon in grado di legare covalentemente gli RNA.

- **Western blotting**

La metodica consiste nel trasferimento su membrana di nitrocellulosa/nylon di proteine separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide. Le proteine, una volta fissate stabilmente al supporto solido, possono essere analizzate sfruttando la loro capacità di interazione con una serie di ligandi, generalmente anticorpi.



Comparison of Southern, Northern, and Western blotting techniques

	Southern blotting	Northern blotting	Western blotting
Molecule detected	DNA (ds)	mRNA (ss)	Protein
Gel electrophoresis	Agarose gel	Formaldehyde agarose gel	Polyacrylamide gel
Gel pretreatment	Depurination, denaturation, and neutralization	-	-
Blotting method	Capillary transfer	Capillary transfer	Electric transfer
Probes	DNA Radioactive or nonradioactive	cDNA, cRNA Radioactive or nonradioactive	primary antibody
Detection system	Autoradiography Chemiluminescent Colorimetric	Autoradiography Chemiluminescent Colorimetric	Chemiluminescent Colorimetric

Marcatura di acidi nucleici

La marcatura degli acidi nucleici prevede l'uso di **traccianti radioattivi sotto forme di dNTP radioattivi o, in alternativa, fluorescenti, enzimatici o chemiluminescenti.**

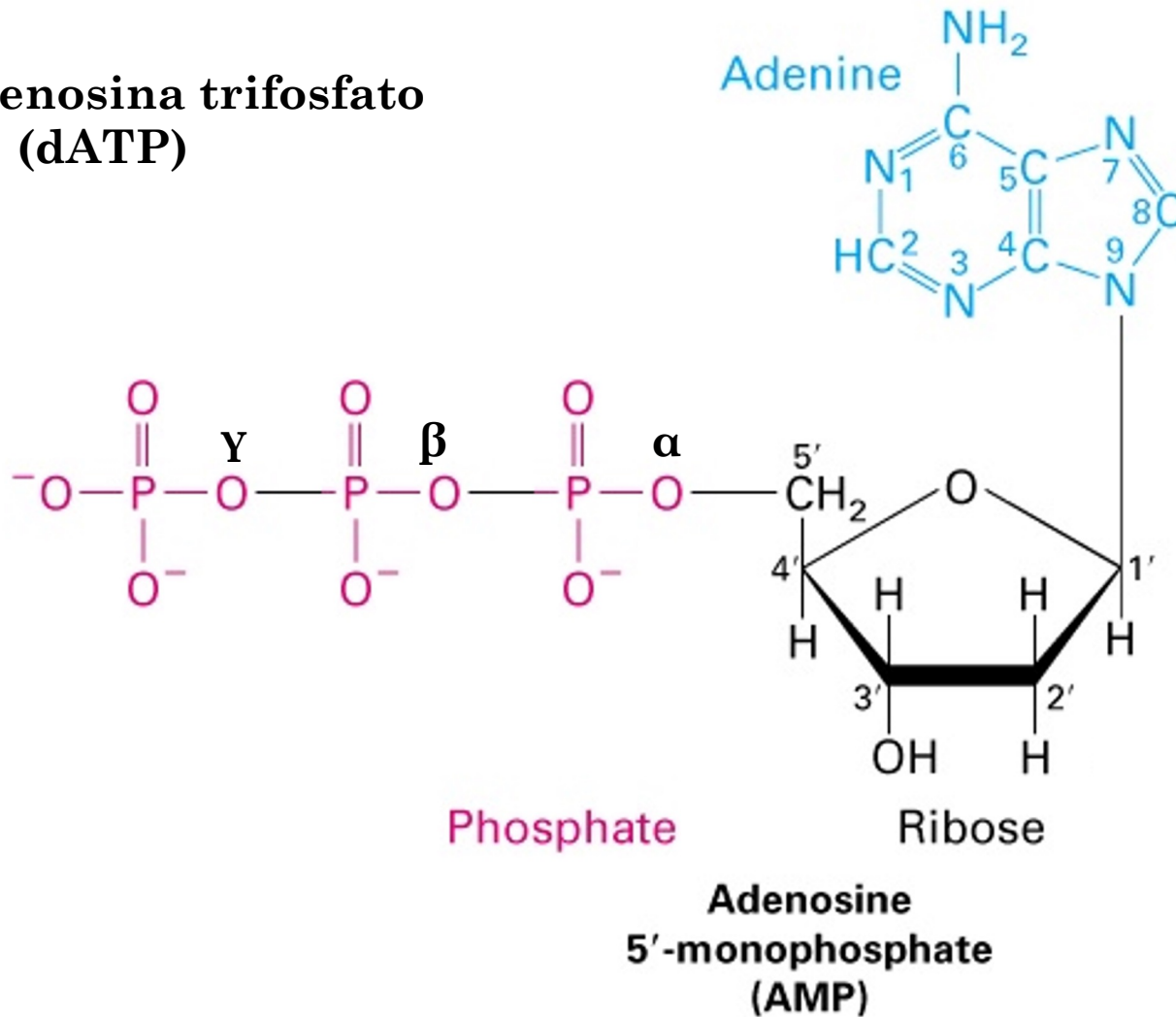
I radioisotopi generalmente usati sono **P^{32} dNTP**, o **S^{35} dNTP**

In tutti i casi si pone il problema di **incorporare** il dNTP modificato, di solito radioattivo, in un frammento di DNA; dobbiamo, cioè, preparare una sonda da utilizzare in esperimenti di ibridazione molecolare.

I principali metodi di marcatura sono:

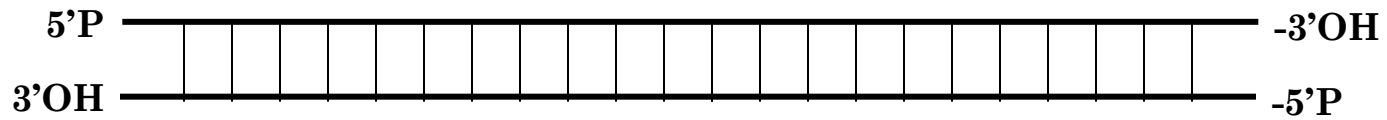
- Marcatura terminale al 5' utilizzando la **polinucleotide chinasi**
- Nick translation
- Random priming

Deossiadenosina trifosfato (dATP)

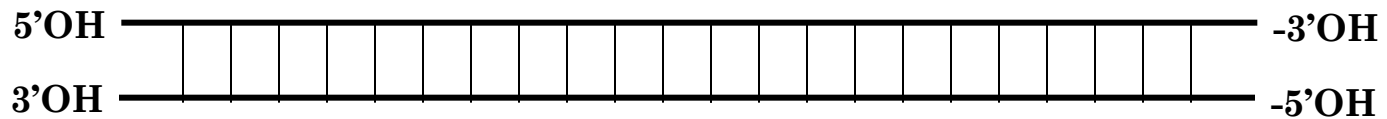


Le unità di fosfato si designano α , β e γ . Il fosfato α si fissa direttamente al 5' dello zucchero deossiribosio. **Durante la sintesi del DNA il fosfato α prende parte alla formazione del legame fosfodiesterico, mentre i gruppi β e γ vengono rilasciati come unità di pirofosfato**

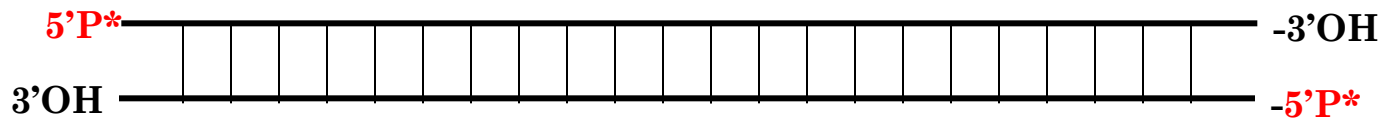
Marcatura terminale al 5'



Trattamento con fosfatasi

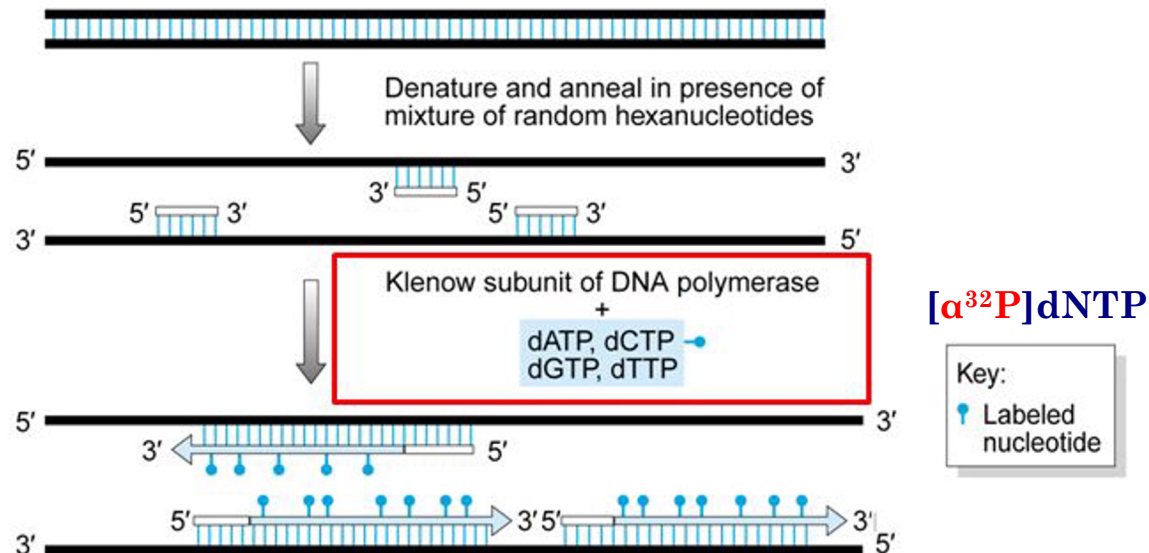


Polinucleotide
chinasi
+ [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP



Random priming

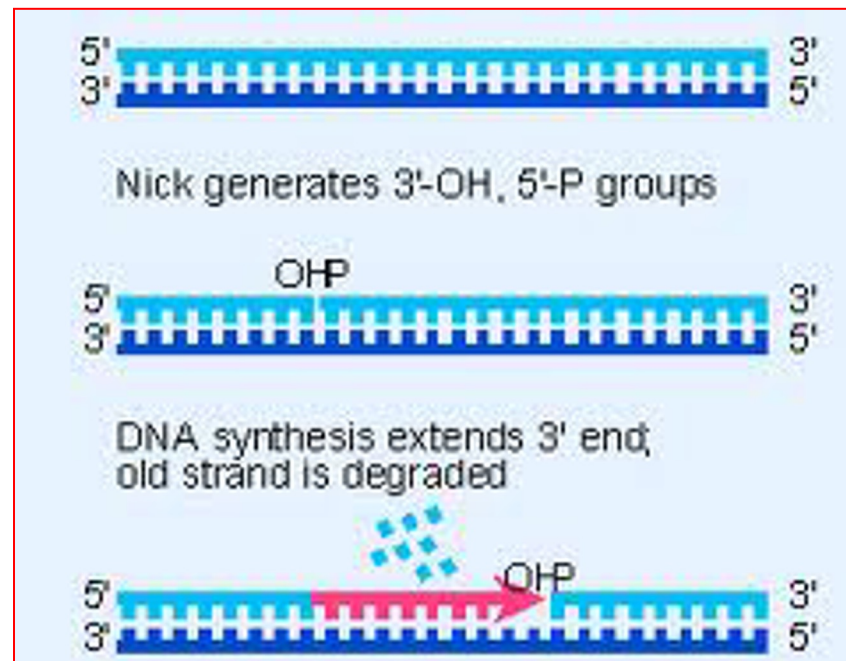
Si basa sull'ibridazione casuale di una miscela di tutti i possibili esanucleotidi alla forma **a singola elica** di un frammento di DNA sonda. Il filamento complementare è sintetizzato a partire dall'estremità -3'OH degli esanucleotidi che riescono ad appaiarsi alla sonda utilizzando l'attività polimerasica della **Klenow polimerasi**. Per la marcatura si utilizzano **[$\alpha^{32}\text{P}$]dNTP**



Klenow:
attività endonucleasica 5' \rightarrow 3'
no esonucleasica 5' \rightarrow 3'
(distruggerebbe primer)
si esonucleasica 3' \rightarrow 5'

Nick translation

Questo tipo di marcatura si effettua utilizzando **la proprietà 5'→3' e 3'→5' esonucleasica della DNA polimerasi I**. A bassa concentrazione enzimatica e in presenza di Mg^{++} , la DNA pol I introduce interruzioni a singolo filamento (nicks). La presenza di un “nick” fornisce alla DNA pol I l'estremità -OH su cui innescare la reazione di sintesi. L'attività 5'→3' esonucleasica dell'enzima rimuove contemporaneamente nucleotidi, in direzione di sintesi sostituendoli con i dNTP, in largo eccesso, forniti nella reazione. Per la marcatura si utilizzano **[alpha³²P]dNTP**, in genere [alpha³²P]dATP



Metodi non radioattivi

I nucleosidi trifosfati possono essere coniugati a qualunque tracciante a condizione che questo non pregiudichi il normale funzionamento delle polimerasi.

• Nucleotidi biotinilati

Questi nucleotidi biotinilati portano un residuo di **biotina legato ad un UTP** in posizione 5'. La risultante struttura mima bene quella del TTP e viene tollerata bene dalla DNA polimerasi durante l'allungamento della catena. La biotina può essere successivamente riconosciuta dalla **streptavidina o da anticorpi anti-avidina** generalmente coniugati ad enzimi (BAP: Bacterial Alkaline Phosphatase, HRP: Horseradish Peroxidase ecc.) e rivelati enzimaticamente o per chemiluminescenza.

• Nucleotidi coniugati alla digossigenina

La digossigenina è uno **steroide** isolato da Digitalis purpurea. Anch'essa si lega **al 5' dell'UTP** e, nonostante le grandi dimensioni, viene ben tollerato dalla DNA polimerasi. Viene poi riconosciuta da **anticorpi anti-digossigenina coniugati a BAP o HRP** e rivelata enzimaticamente o per chemiluminescenza.

Ibridazione di Acidi Nucleici su membrana

L'ibridazione degli acidi nucleici su membrana è una tecnica ampiamente utilizzata nella manipolazione genica.

La velocità dell'ibridazione, la sua specificità ed il livello di sensibilità dei segnali rilevabili dipendono dalla composizione del tampone in cui avviene la reazione.

Componenti che aumentano la cinetica di ibridazione

Detergenti e agenti bloccanti: servono a ridurre la % di legame non specifico tra sonda e membrana. (Denhardt, SDS)

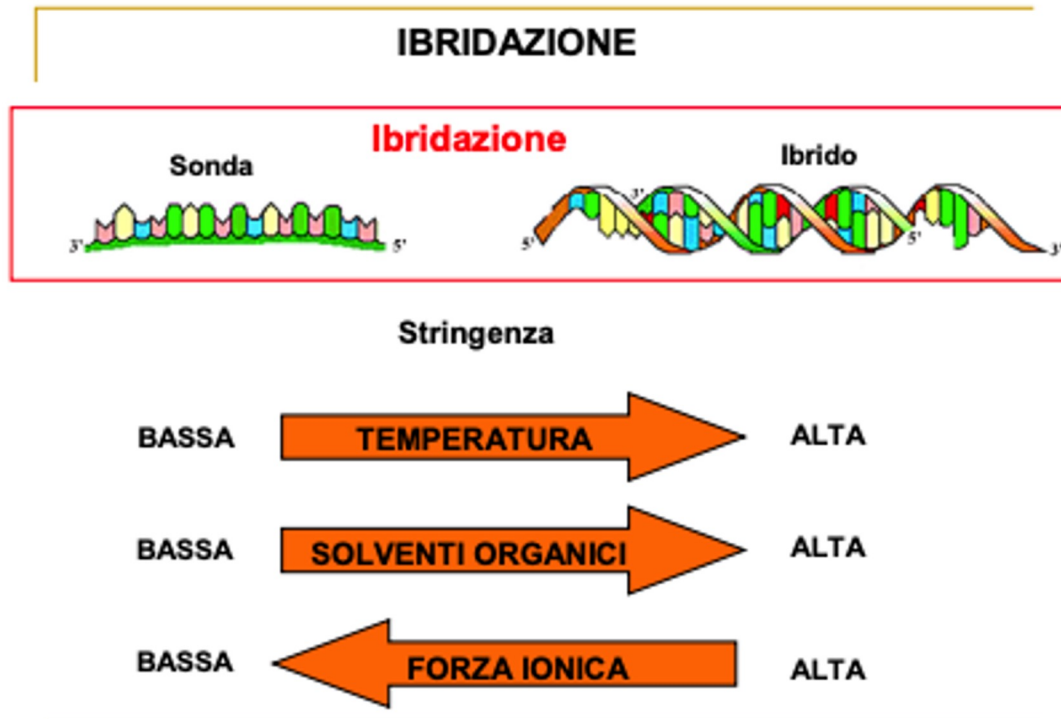
Agenti denaturanti: diminuiscono la temperatura di denaturazione della molecola ibrida formata da sonda e DNA bersaglio, quindi permettono di ridurre la temperatura di ibridazione.

DNA eterologo: permette di ridurre i segnali aspecifici di ibridazione saturando sulla membrana quei siti di legame che potrebbero interagire con la sonda.

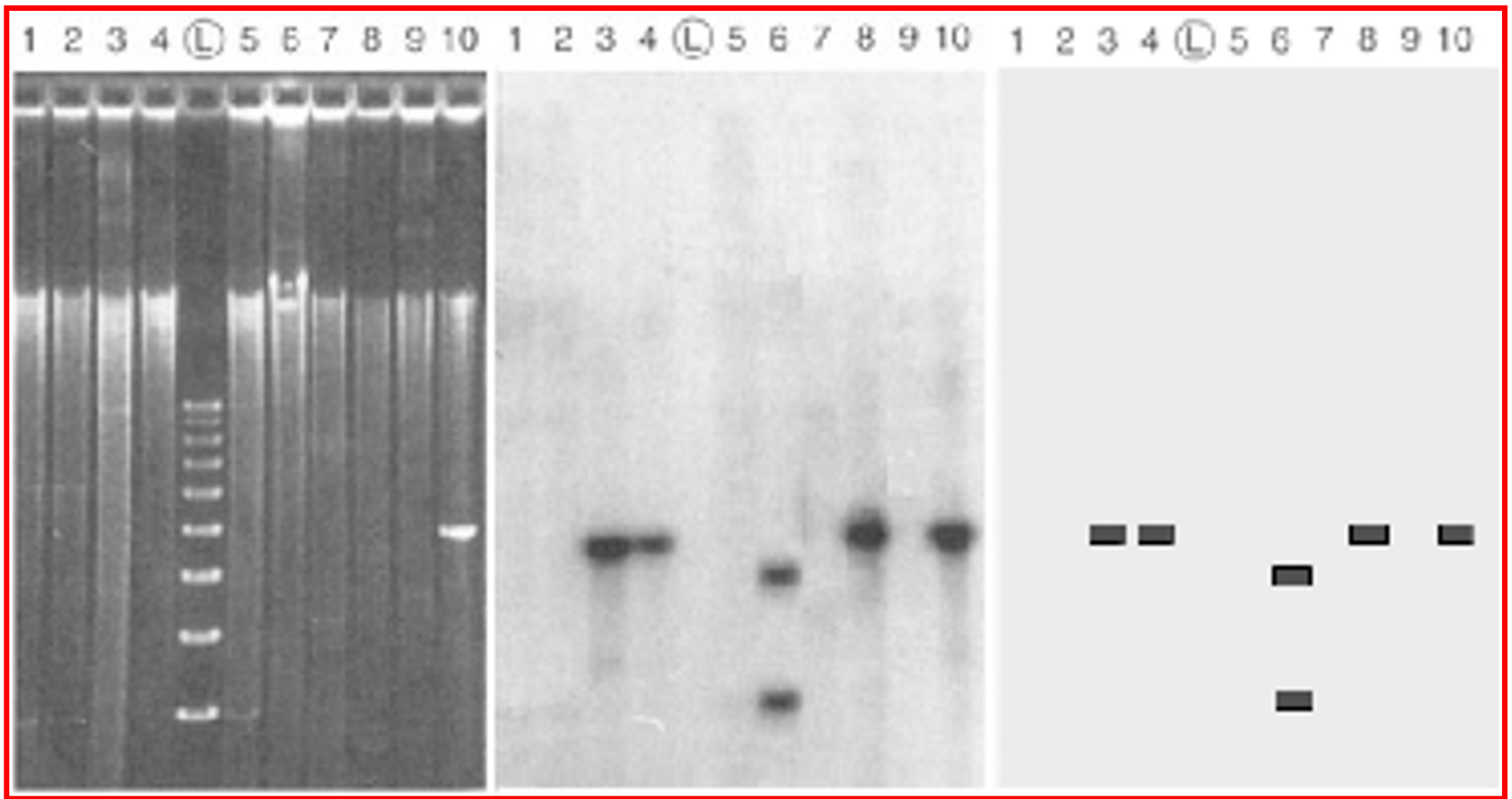
Controllo della Stringenza

La stringenza è la specificità con cui una sonda si lega ad una determinata sequenza bersaglio sul DNA

In condizioni di alta stringenza la sonda si potrà ibridare solo ad una sequenza ad essa complementare, mentre in condizioni di bassa stringenza l'ibridazione potrà avvenire anche con sequenze parzialmente complementari.



Southern Blot



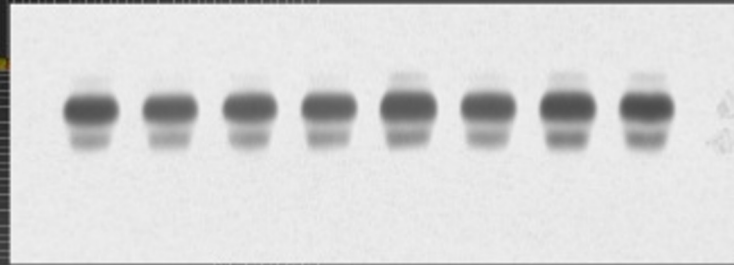
Gel con EtBr

**Lastra
autoradiografica**

schema

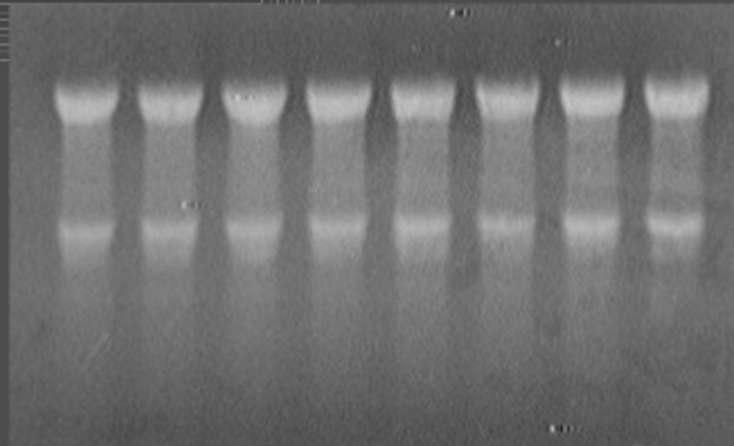
Un esempio di Northern Blot

Northern blot



Lastra
autoradiografica

RNA gel

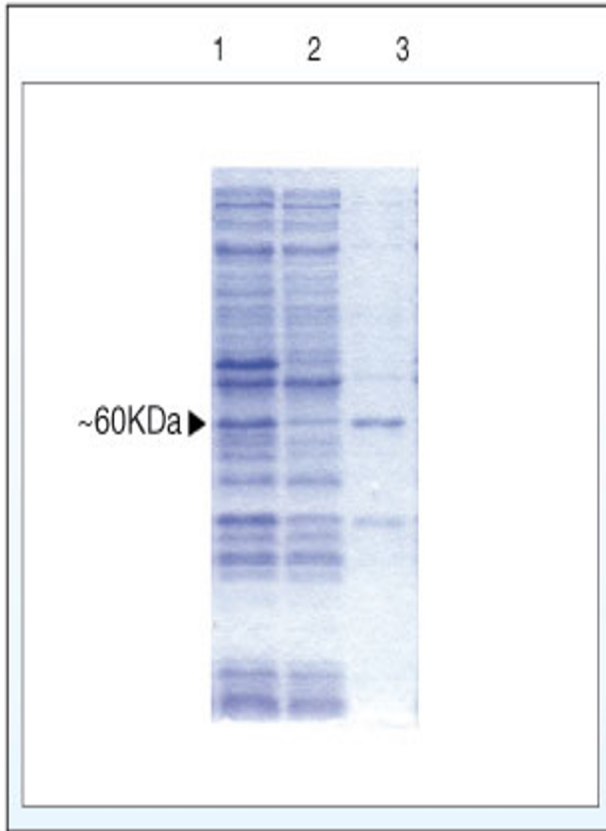


— 28 S
Gel con EtBr
— 18 S

Western Blot

B

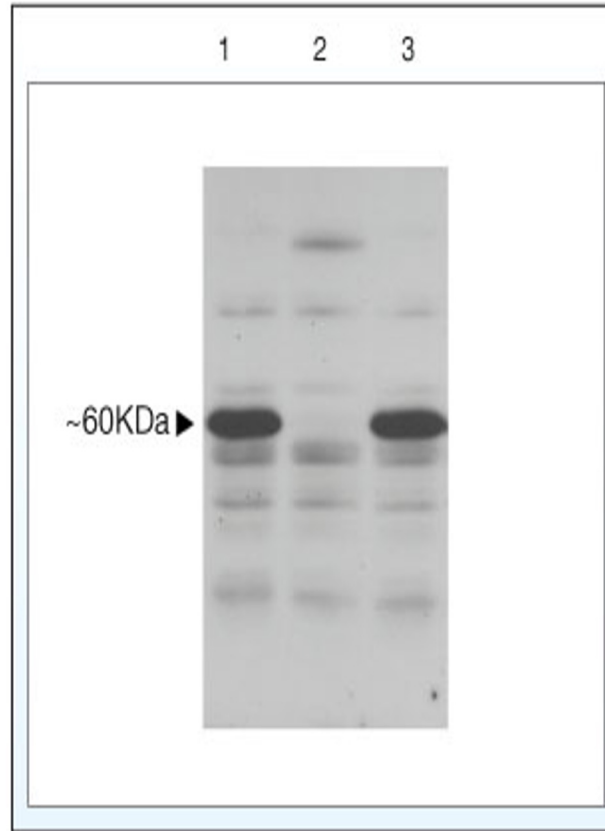
Gel colorato con Comassie blue



Gel con Comassie blu

C

Western Blot con un anticorpo specifico



**Lastra
autoradiografica**

Meno 1!!!!!!!

