

Il **CLONAGGIO** consiste nella “moltiplicazione” di un frammento di DNA appartenente ad un dato genoma.

Ciò è possibile grazie a delle endonucleasi che provocano delle rotture interne a doppio filamento sul DNA in corrispondenza di specifiche sequenze nucleotidiche (**Enzimi di Restrizione**) e a una piccola molecola di DNA che serve da “carrier” (**Vettore di Clonaggio**).

Successivamente si avrà la replicazione di questo DNA ricombinante (**Clone**) milioni di volte fornendo un gran numero di copie del clone stesso.

Il risultato è **l'amplificazione selettiva** di quel determinato frammento di DNA

ER di classe II

Esistono tre classi principali di ER: quelli di tipo I, di tipo II e di tipo III.

tipo I: attività di restrizione e metilazione sulla stessa molecola. Tagliano il DNA **in modo casuale lontano dal sito di riconoscimento.**

tipo III: attività di restrizione e metilazione su sub-unità diverse. **Non garantiscono sufficiente specificità di taglio.**

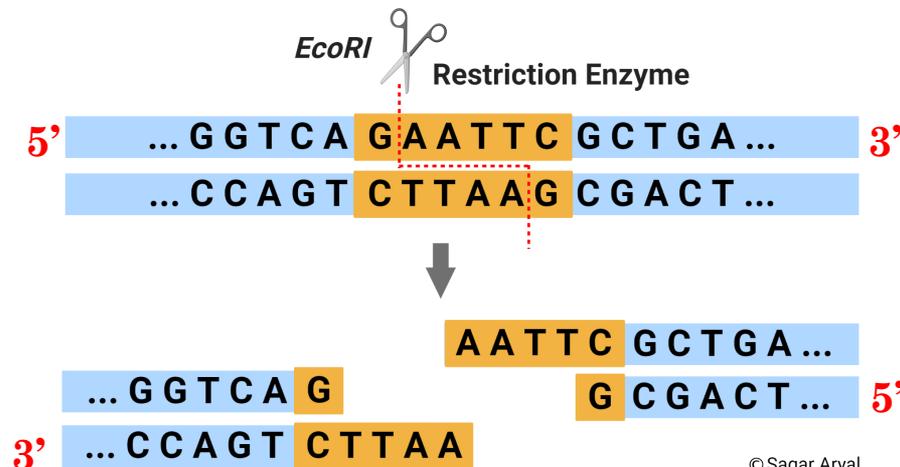
Nessuna delle due classi viene utilizzata in biologia molecolare a causa della loro **aspecificità di taglio.**

Gli enzimi di classe II, invece, portano le due attività su molecole distinte e sono caratterizzati da una elevata specificità di taglio.

Enzimi di restrizione

La scoperta degli enzimi di restrizione, avvenuta negli anni '70, è valsa ai suoi scopritori, Arber, Nathans e Smith, il conferimento del premio Nobel per la Fisiologia e Medicina.

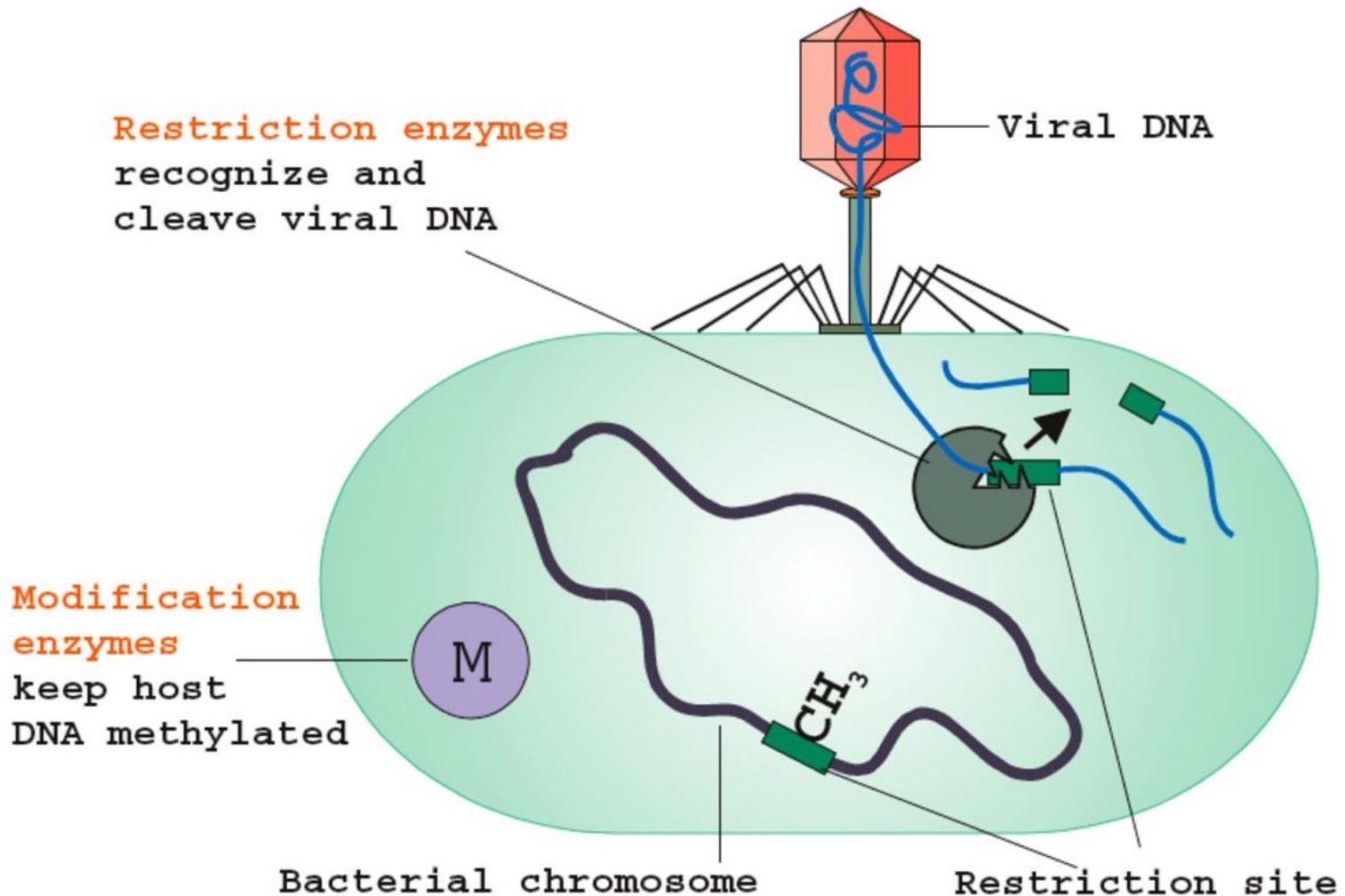
Gli ER riconoscono di solito sequenze **palindromiche**, tagliandole in posizioni specifiche. Un sito di riconoscimento palindromico è una sequenza in cui il filamento superiore e inferiore, **letti in direzione 5' - 3'**, sono uguali. Per es. la sequenza:

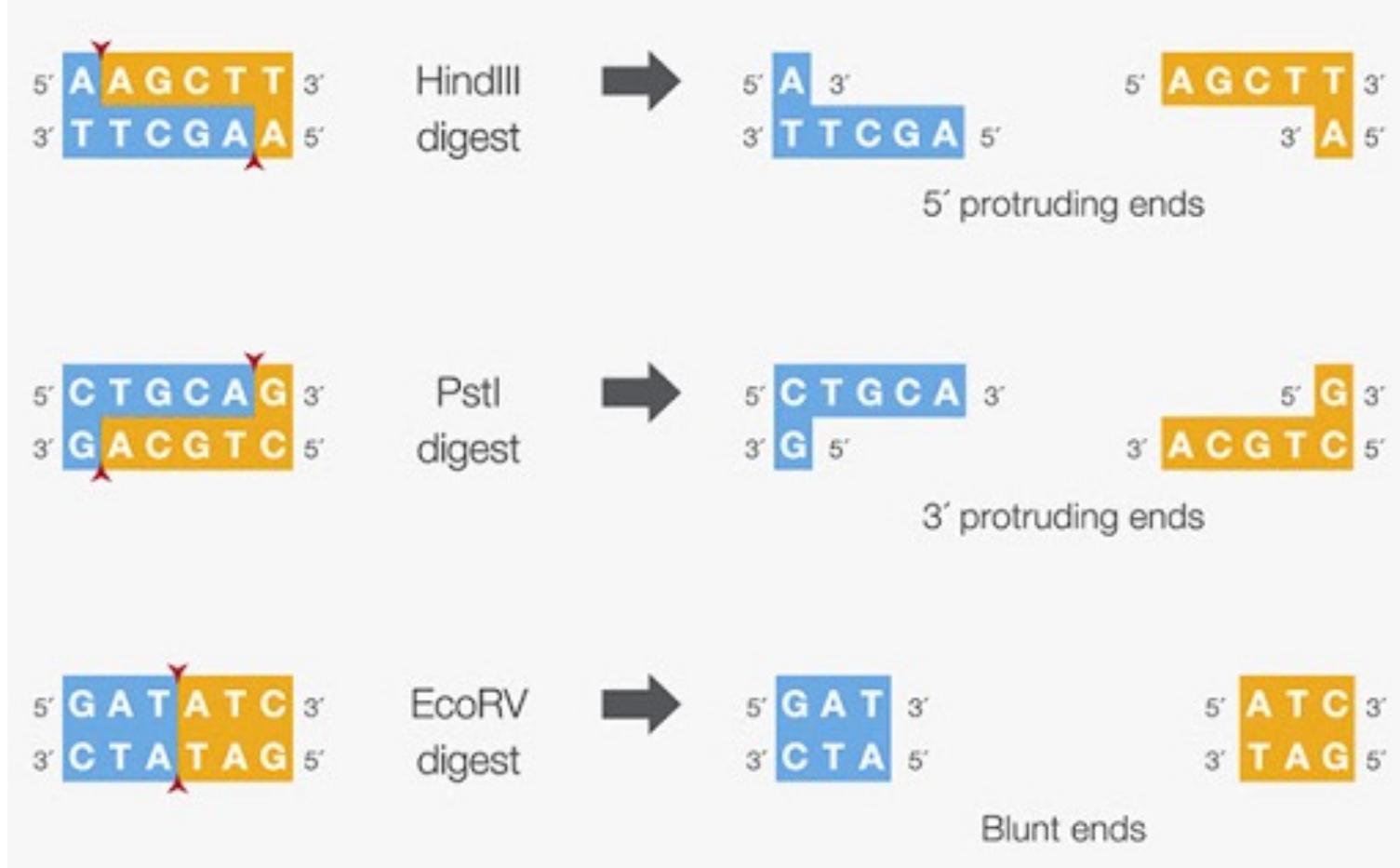


Gli enzimi di restrizione rappresentano il primo esempio di «strategia di sopravvivenza» al DNA esogeno dei microorganismi, poi utilizzato come metodologia di ingegneria genetica.

Infatti.....

Gli ER furono scoperti studiando il fenomeno della **restrizione-modificazione**. L' introduzione in *E.coli* di DNA esogeno risultava nella sua rapida frammentazione in piccoli frammenti (restrizione). L' analisi di un DNA virale rivelatosi capace di resistere alla degradazione, rivelò la presenza di alcune basi metilate.

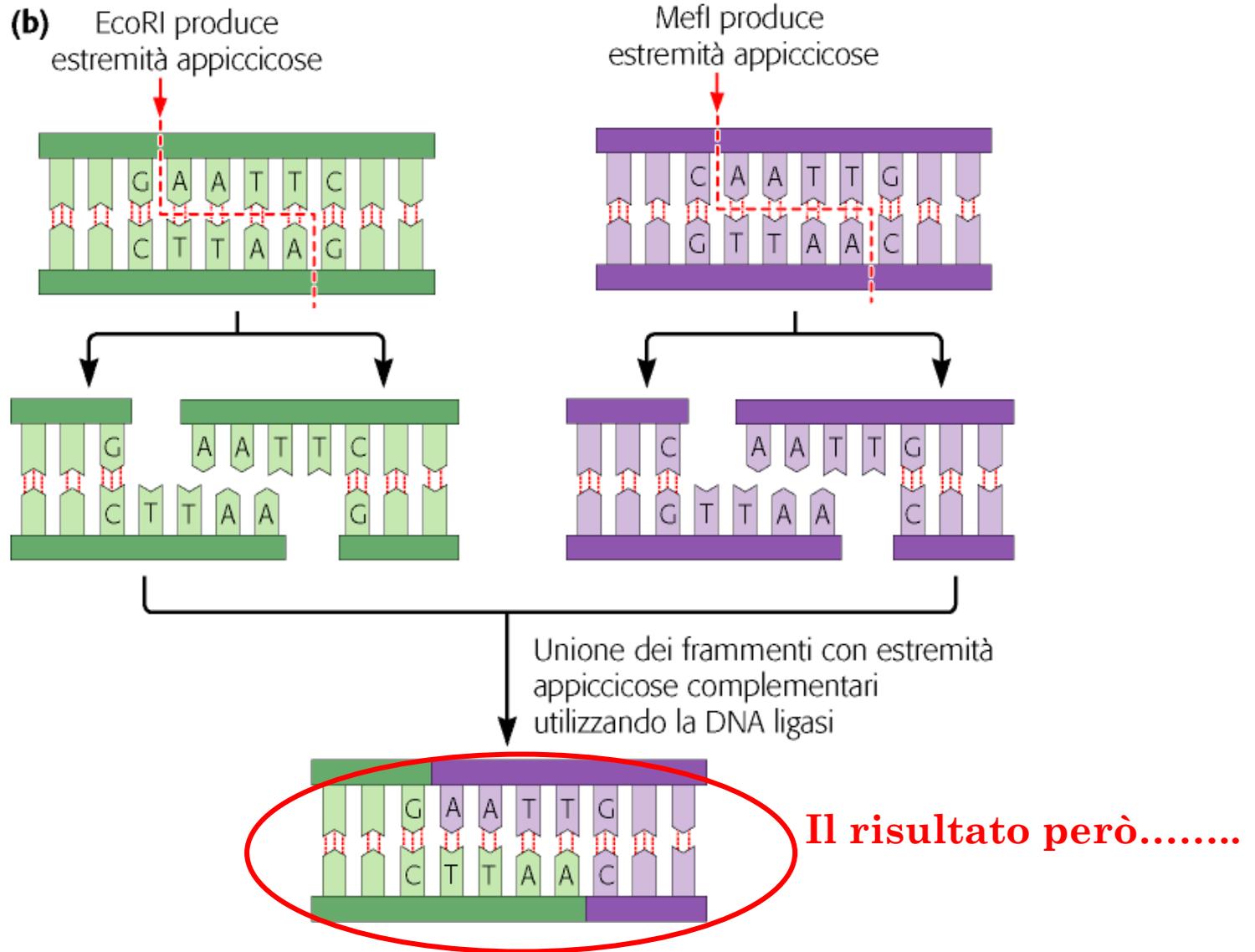




Il numero di basi riconosciute determina la frequenza media di taglio e la dimensione media dei frammenti generati. Enzimi che riconoscono sequenze più corte tagliano più frequentemente e quindi producono frammenti più numerosi e mediamente più corti, degli enzimi che riconoscono sequenze più lunghe.

- ER** che hanno sequenza target di **4 bp** , riconoscono una sequenza target **ogni $1/4^4$**
- ER** che hanno sequenza target di **6 bp** , riconoscono una sequenza target **ogni $1/4^6$**
- ER** che hanno sequenza target di **8 bp** , riconoscono una sequenza target **ogni $1/4^8$**

Alcuni ER, isolati da batteri differenti, riconoscono sequenze di taglio diverse, ma che producono estremità compatibili, come EcoRI e MefI



Isoschizomeri

Alcuni ER, detti isoschizomeri, isolati da batteri differenti, riconoscono la stessa sequenza di taglio. Alcuni di essi tagliano la sequenza nelle stesse posizioni, mentre altri tagliano in posizioni differenti (Acc65I e KpnI)

estremità
5' protruding

estremità
3' protruding

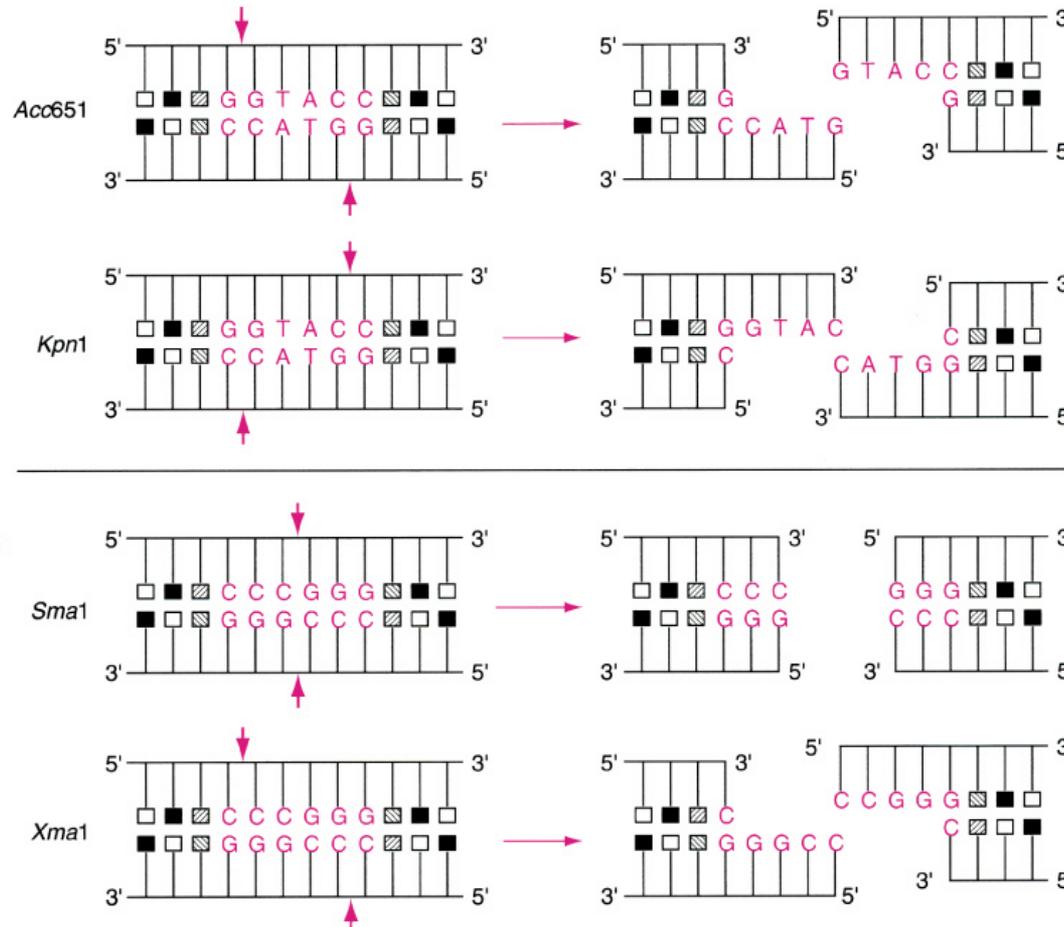
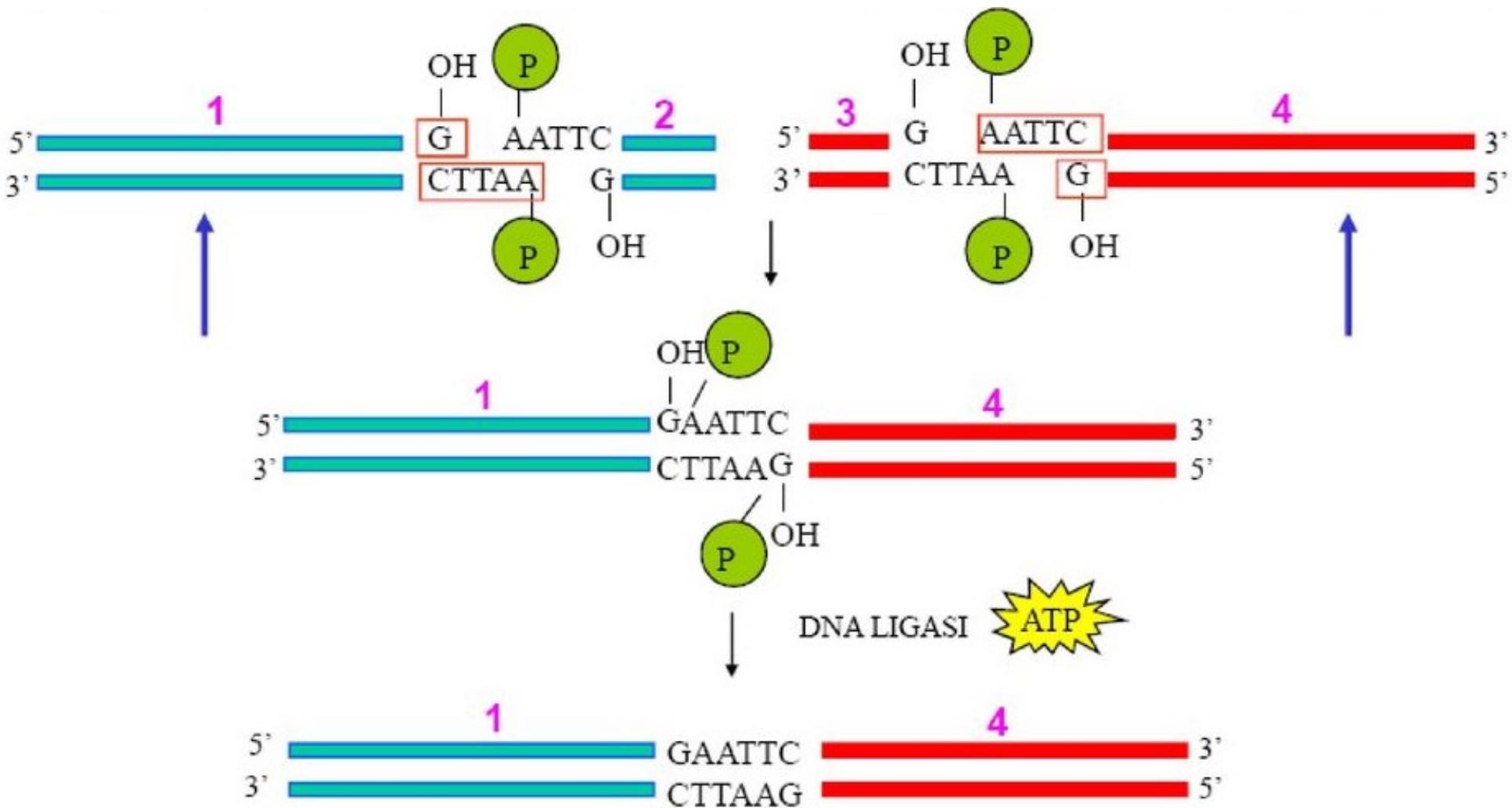


Figura 5.5 Isoschizomeri



La Ligasi



La ligazione

La ligazione va ottimizzata rispetto a:

- temperatura e tempo di reazione
- concentrazione del DNA: totale, dell'inserto e del vettore.

Temperatura

Calcolata tenendo in considerazione che la **stabilizzazione dell'appaiamento tra estremità coesive** è ottimale a basse temperature, mentre **l'attività enzimatica della ligasi** è massima a 37° C. Si utilizza spesso una temperatura di 16° C per 12 ore.

Concentrazione

Basse concentrazioni di DNA totale favoriscono le **reazioni di primo ordine** (intramolecolare) come la **ricircolarizzazione del vettore**. Aumentare la concentrazione totale incrementando la concentrazione di vettore, peggiora la situazione, ma aumentare la concentrazione dell'inserto aumenta la probabilità di avere vettori con inserti multipli.

In genere

DNA Tot \geq 10-20 ng/ μ l

rapporti molarari I:V da 3:1 a 1:1

Vol. fin.= 10-20 μ l.

N.B. si devono utilizzare i **rapporti molarari**

moli = g/PM

Normalmente si considera statisticamente uguale il PM di ogni singolo paio di basi il cui peso medio è 660 Dalton, quindi

moli = g/ 660 x bp

Metafora delle pere da 100gr o da 250gr

Esempio

Vogliamo ligare 50 ng di un vettore di 10 Kb con un inserto di 1 Kb, utilizzando rapporti molari **I/V** 1:1 e 3:1, in due reazioni separate.

Rapporto I/V= 1:1 $50 \text{ ng}/10 \text{ kb} = x \text{ ng}/1 \text{ kb}$

$$x \text{ ng} = 50/10$$

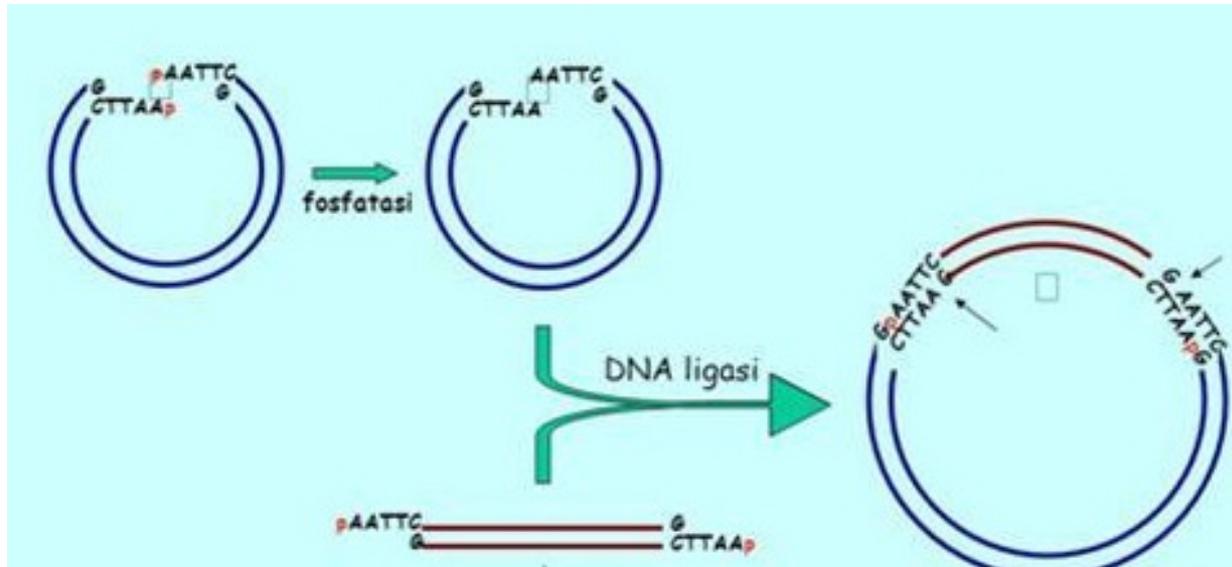
$$x = 5 \text{ ng}$$

Rapporto I/V= 3:1

$$x = 15 \text{ ng}$$

Fosfatasi alcalina

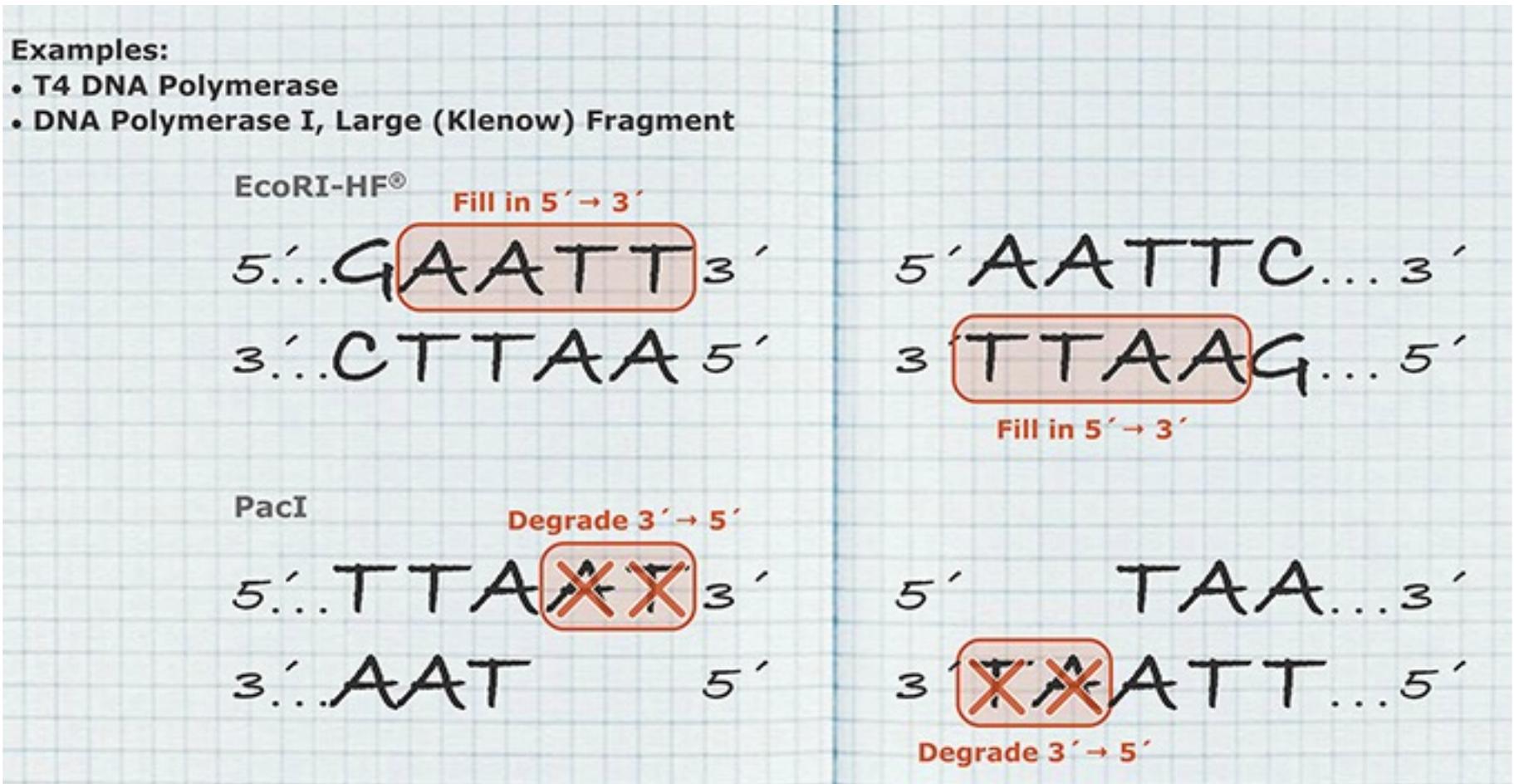
Quando vettore ed inserto sono tagliati con un solo enzima di restrizione, si ha un' elevata frequenza di ricircolarizzazione del vettore.



Una strategia consiste nell' utilizzo di una fosfatasi, come ad esempio la **fosfatasi alcalina** (BAP), un enzima che rimuove il gruppo fosfato al 5' impedendo così l' azione della ligasi. La defosforilazione del vettore con una fosfatasi impedisce la ricircolarizzazione del vettore, abbassando sensibilmente il background.

- Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con sticky ends 5' - protruding (es. EcoRI) **FILL IN**

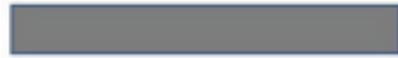
- Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con sticky ends 3' - protruding (es. PstI) **TRIMMING**



Linkers

Linker molecule with EcoRI site

5'- CCGAATTCGG-3'
3'- GGCTTAAGCC-5'



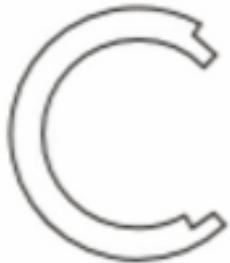
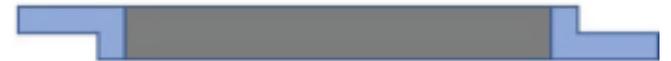
Foreign DNA
(insert)



Linker molecules



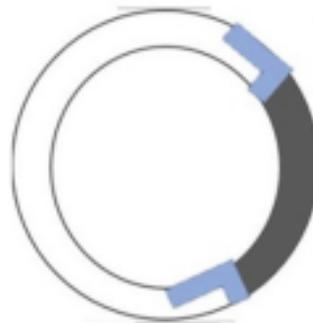
EcoRI



Vector cleaved with EcoRI

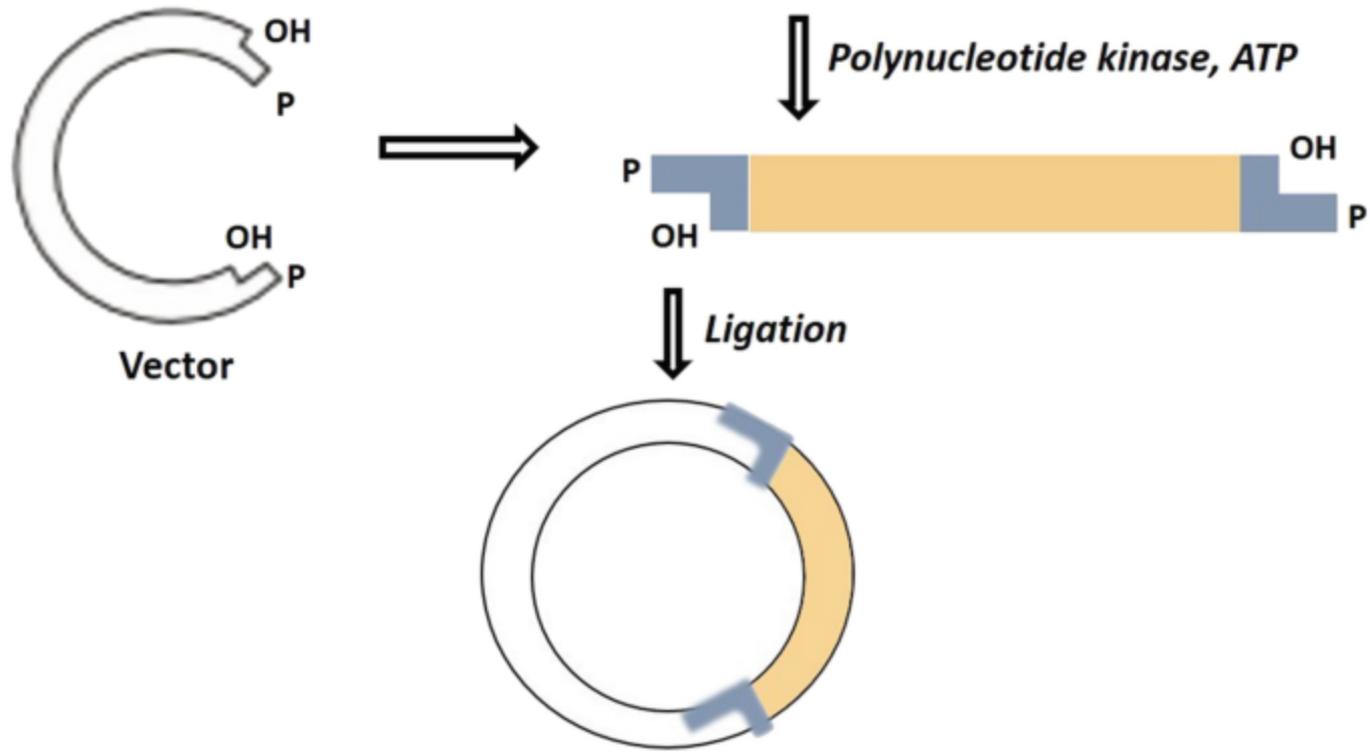
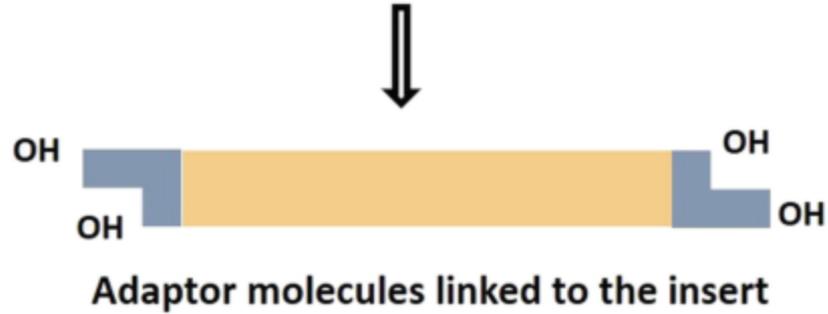
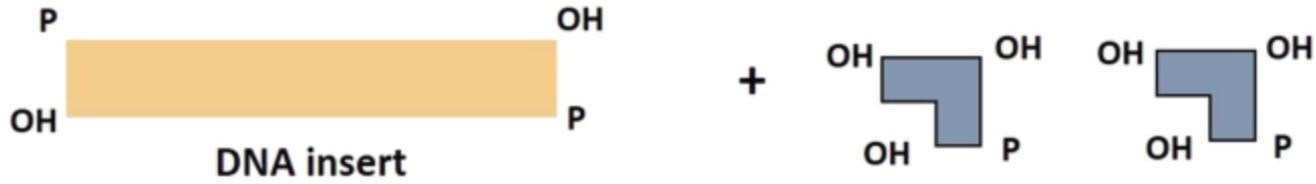


DNA ligase



Adaptors

5' OH- GATCCCCGGG- OH
3' - GGGCCC- P
Adaptor molecule with free 5' OH end



Linker

Adaptor

DEFINITION

Linker is a synthetic oligonucleotide sequence that is blunt at two ends

Adaptor is a short synthetic oligonucleotide sequence with one blunt end and one sticky end

ENDS

Two blunt ends

One blunt end and one sticky end

SINGLE STRANDED TAIL

No tail

Has one tail

FORMING DIMMERS

Linkers do not form dimers

Adaptors can form dimers