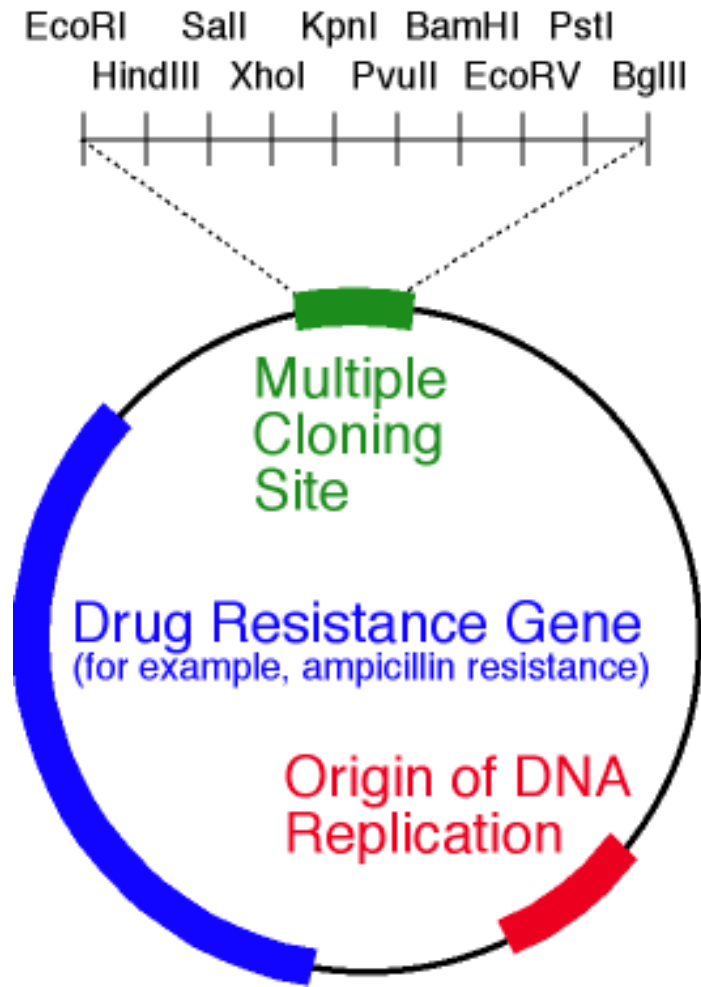


A petri dish containing a bacterial culture on a dark red agar medium. The surface is covered with numerous small, pinkish-red colonies. A vertical streak of more densely packed colonies runs down the center of the dish. The text "Tecniche e strategie di Clonaggio" is overlaid in white on the center of the image.

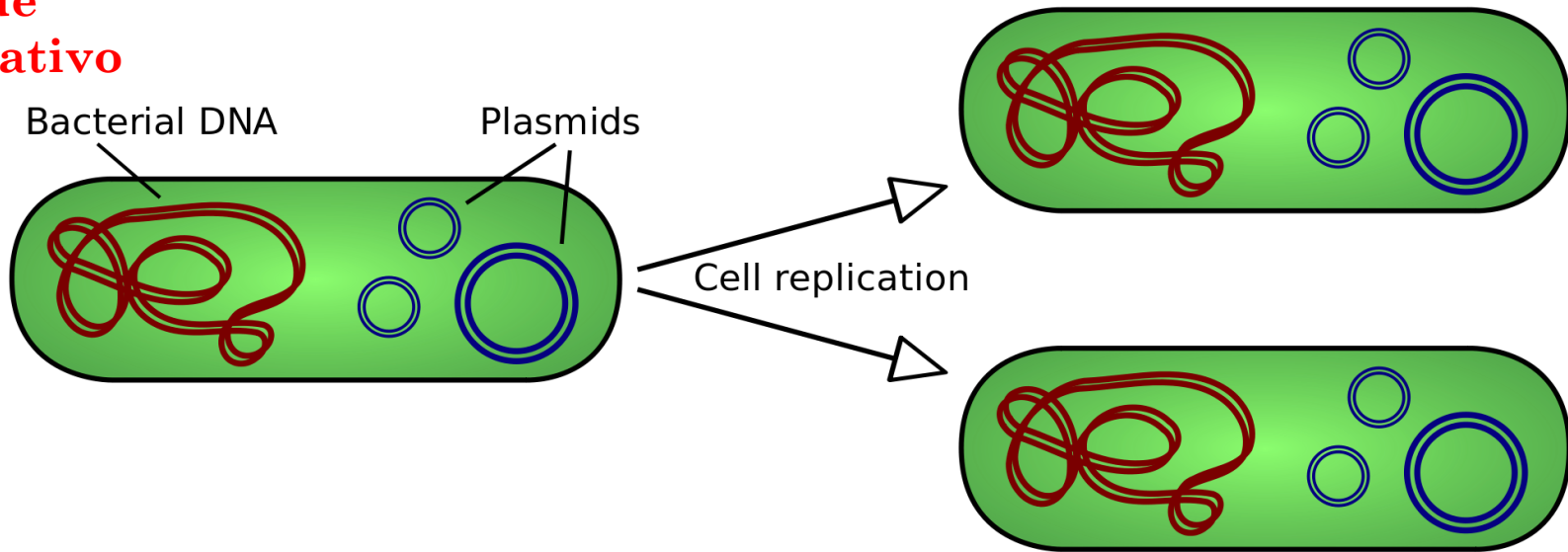
Tecniche e strategie di Clonaggio

Un classico vettore plasmidico

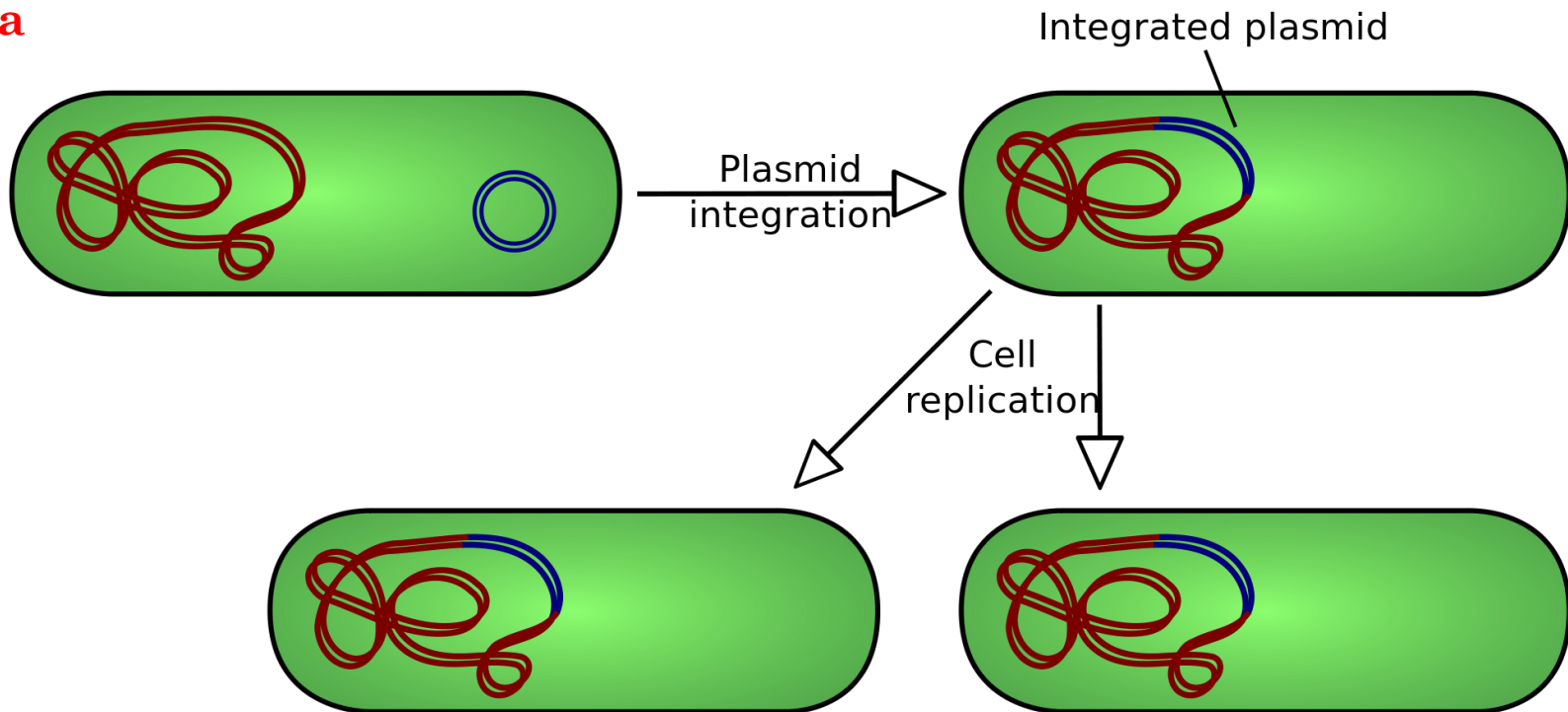


I vettori plasmidici sono derivati dai plasmidi batterici naturali. I plasmidi sono degli **elementi genetici extracromosomali** che si replicano autonomamente. Possono essere **lineari** o **integrati nel cromosoma batterico** (episomi) ma, nella maggior parte dei casi, sono **molecole di DNA circolare**.

Plasmide non integrativo



Episoma



Le caratteristiche **comuni a qualsiasi vettore** plasmidico sono:

Marcatore selezionabile

Necessario per **selezionare le molecole ricombinanti**. Inoltre, sotto un'appropriata pressione selettiva, **stabilizza il plasmide**.

Nei batteri: geni di resistenza agli antibiotici. (il gene per la β -lattamasi codifica per un enzima capace di idrolizzare l'anello lattamico degli antibiotici di tipo penicillinico)

Sito unico per un' endonucleasi di restrizione

non deve essere presente in regioni **cis essenziali** o in geni che codificano per **funzioni essenziali**.

Origine di replicazione (ori)

Permette la replicazione autonoma, e controlla **il numero di copie** e **la specificità d'ospite**

I vettori plasmidici sono classificati in base alle dimensioni dell'inserito di DNA che un vettore può accettare

- VETTORI PLASMIDICI -> 0-10 kb

- VETTORI λ di inserzione -> 0-10 kb
- VETTORI λ di sostituzione -> 9-23 kb
- VETTORI COSMIDICI -> 30-44 kb
- VETTORI PAC (crom. artif. P1) -> 130-150 kb
- VETTORI BAC (crom. artif. batt.)-> fino a 300 kb
- VETTORI YAC (crom. artif.lievito-> 0.2-2 Mb

I plasmidi si replicano con due modalità diverse.

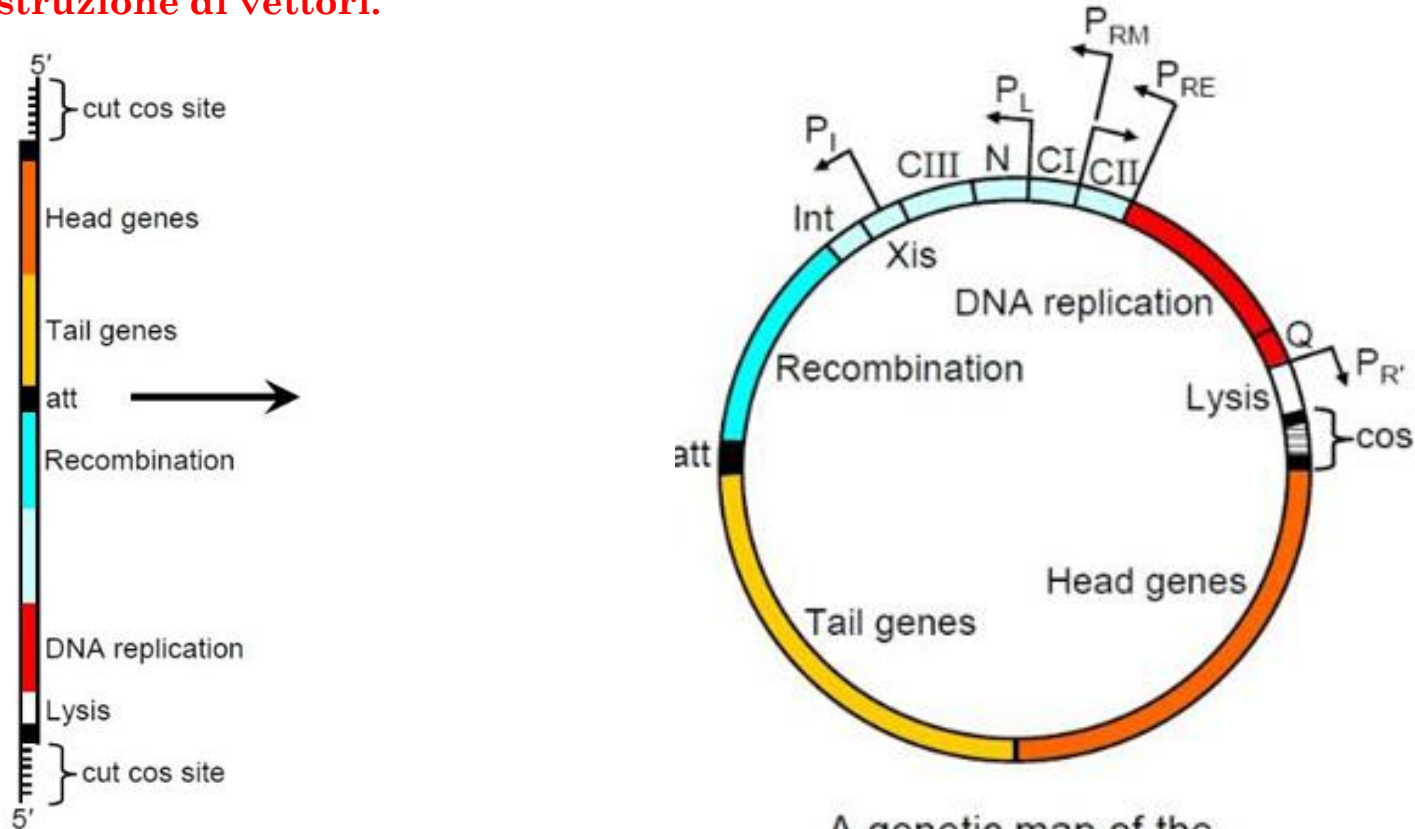
- **in maniera coordinata con la replicazione del cromosoma batterico**, generalmente quelli di grandi dimensioni, e si dicono a **controllo stringente**. In genere a basso numero di copie, codificano per proteine necessarie alla loro replicazione.
- **in maniera indipendente dalla replicazione batterica**, in genere di piccole dimensioni, e si dicono a **controllo rilassato**. Ad alto numero di copie, generalmente dipendono da proteine dell'ospite per la loro replicazione.

Plasmide	ori	numero di copie
PBR322 e derivati	PMB1	15-20
PUC e derivati	ColE1	500-700
pACYC e derivati	p15A	10-12
pSC101 e derivati	pSC10	1 -5

I Batteriofagi

Il DNA di λ è una **molecola lineare a doppio filamento di 48,5 Kb**, caratterizzata dalla presenza alle estremità 5' dai **siti cos (ss)** che permettono la circolarizzazione di λ dopo l'infezione. Il genoma può essere suddiviso in tre gruppi funzionali:

- La regione sinistra codifica per **proteine strutturali della testa e della coda**.
- La regione destra contiene geni coinvolti nella **replicazione del DNA e nel ciclo litico**.
- La regione centrale con i geni per la **lisogenia**. **Gran parte di questa regione viene eliminata per la costruzione di vettori**.

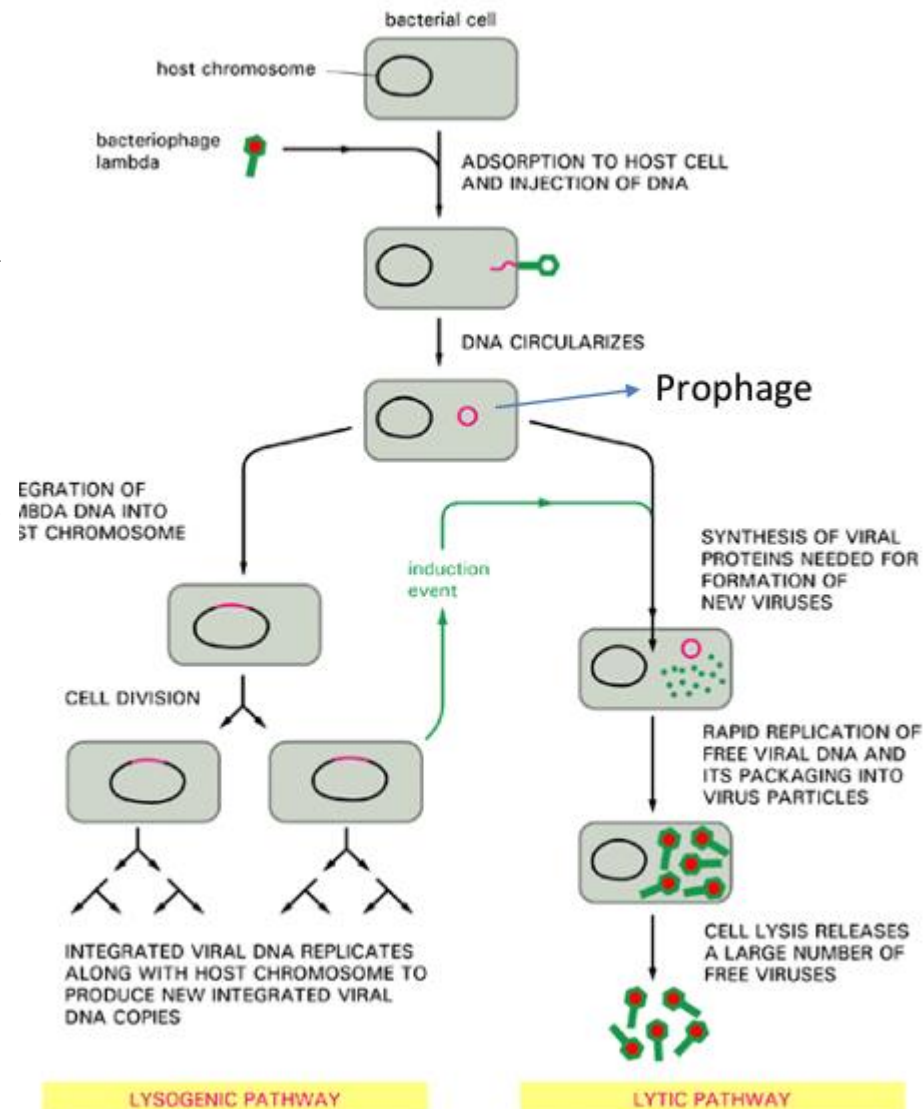


A genetic map of the
lambda phage genome

I vettori derivati dal fago λ

Il fago λ è capace di integrarsi nel genoma batterico. Il batteriofago λ può utilizzare due stili di vita all'interno del batterio: il ciclo litico e il ciclo lisogenico

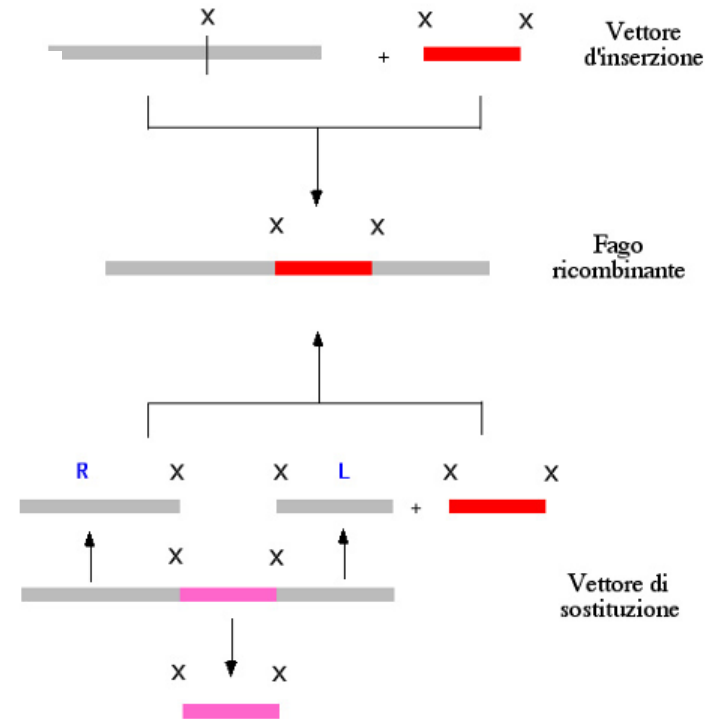
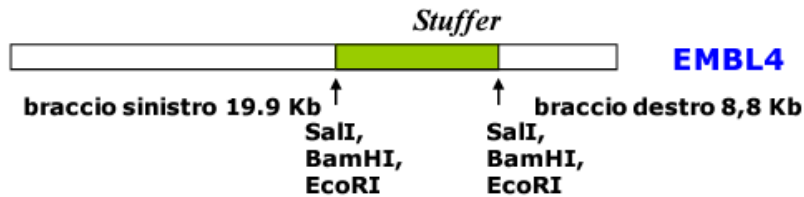
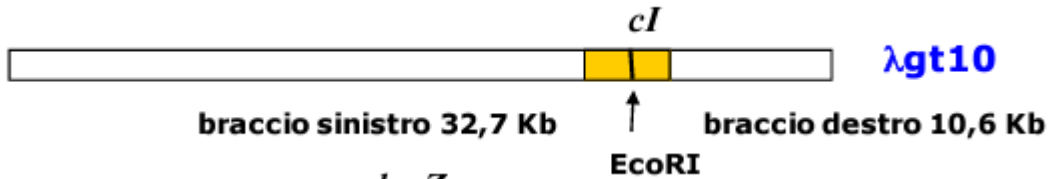
- 1- durante un'infezione litica il DNA virale è introdotto, sotto forma di DNA lineare di circa 48.5Kb, all'interno della cellula batterica;
- 2- una volta all'interno della cellula, il DNA fagico ricircularizza, sfruttando le sue estremità coesive *cos*, e si replica come molecola circolare. Da un certo momento in poi, lambda comincia a replicarsi con una modalità di tipo "rolling circle", cominciando a formare lunghi concatenamenti di singoli genomi fagici;
- 3- contemporaneamente si esprimono i geni strutturali che assemblano delle teste "vuote", dove vengono inseriti singole unità di lambda (un DNA di 48.5Kb definito da due siti *cos*).
- 4- infine viene assemblata la coda e i fagi lisano il batterio e fuoriescono.



Sono stati sviluppati due tipi di vettori λ :

-**vettori d'inserzione**, in cui il DNA esogeno è inserito in un sito unico di restrizione;

-**vettori di sostituzione**, in cui il DNA esogeno sostituisce un pezzo di DNA del vettore (stuffer).



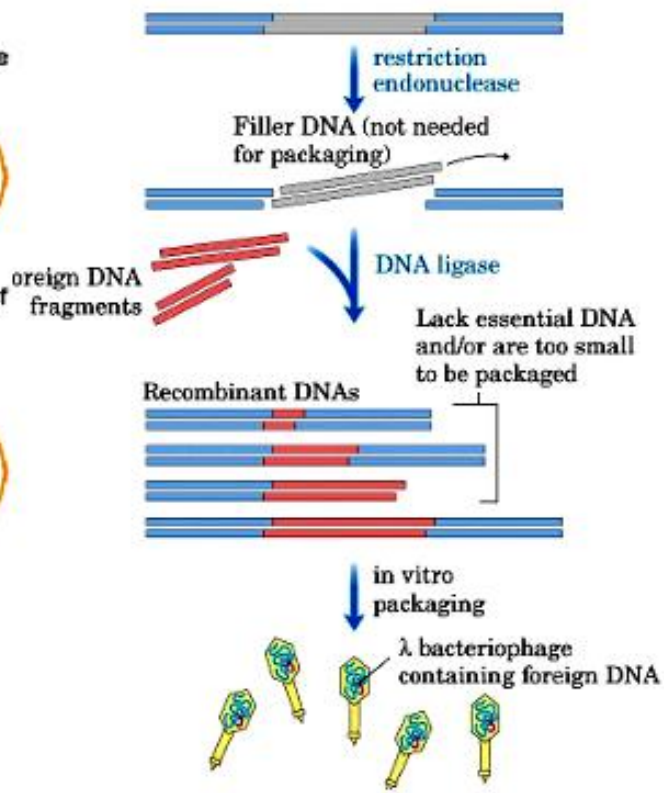
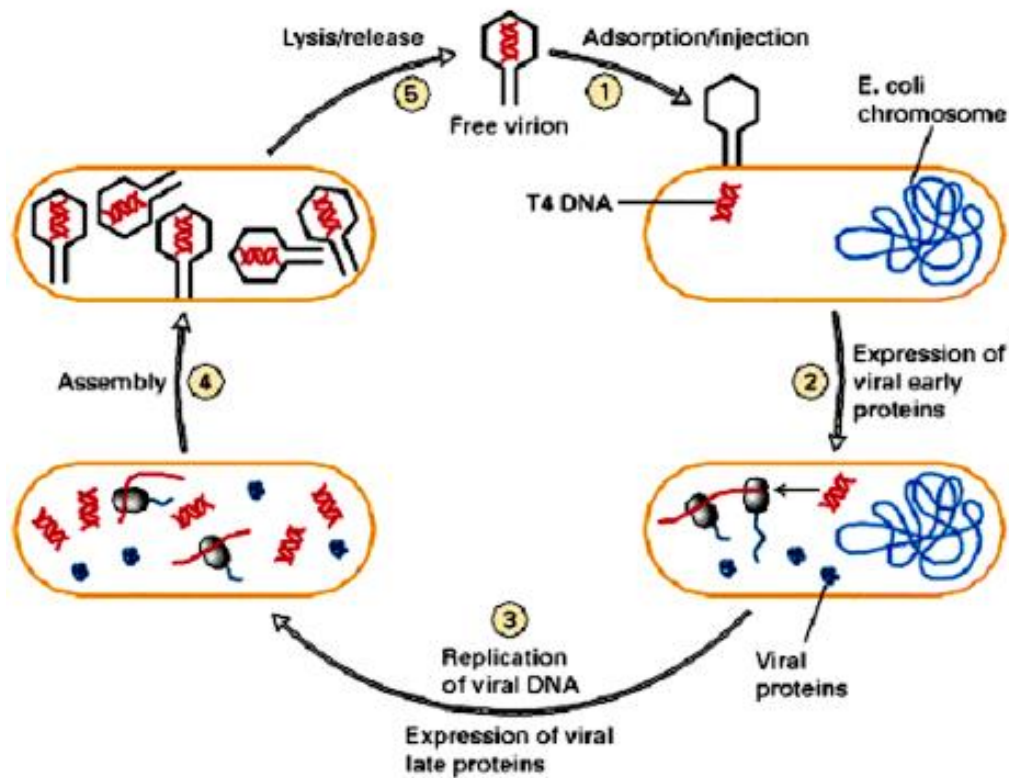
λ gt10 è un esempio di inattivazione inserzionale. Il sito EcoRI è nel gene *cI*. Quindi un'inserzione al suo interno, distruggerà l'integrità strutturale del repressore e il fago non sarà più in grado di entrare nel ciclo lisogeno.

I vettori con un sito di taglio, possono accettare inserti da 8 a 12 Kb

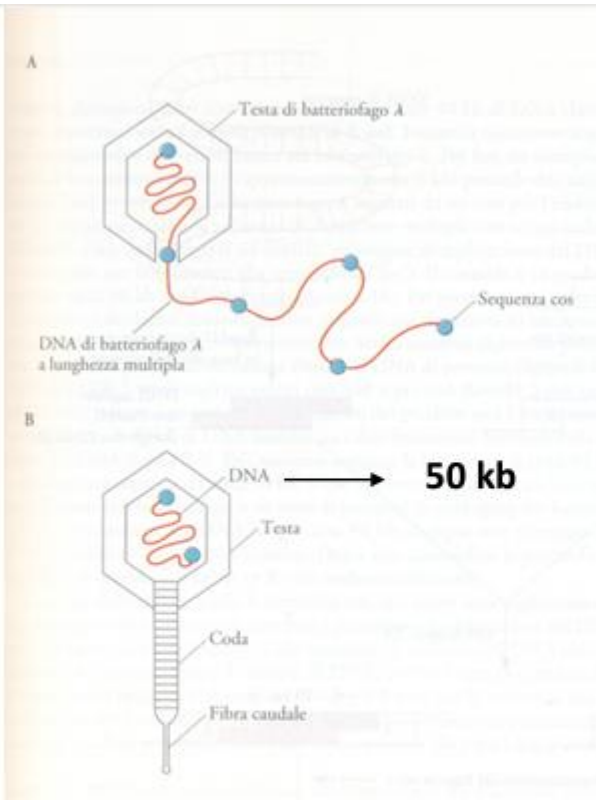
λ EMBL4 (42Kpb) contiene uno stuffer di 14 kpb tra il bracciodestro e sinistro

I vettori con due siti di taglio, in cui la parte centrale del DNA (frammento stuffer) può essere rimossa e sostituita con un frammento di DNA estraneo, possono accettare inserti da 10 a 22 Kb

Clonaggio in λ



Phages can be used to amplify and trasport DNA
→ Phages are used as recombinant DNA



Il packaging in vitro sfrutta l'esistenza di fagi mutanti, che producono teste fagiche vuote, in quanto mancanti di una proteina necessaria per il packaging, e di fagi capaci di effettuare il packaging ma incapaci di produrre le teste.

Mescolando in provetta queste due popolazioni fagiche insieme al nostro DNA, avremo un'efficiente packaging in vitro.

I fagi ricombinanti saranno quindi utilizzati per infettare una popolazione di batteri sensibili ai fagi in soft agar.

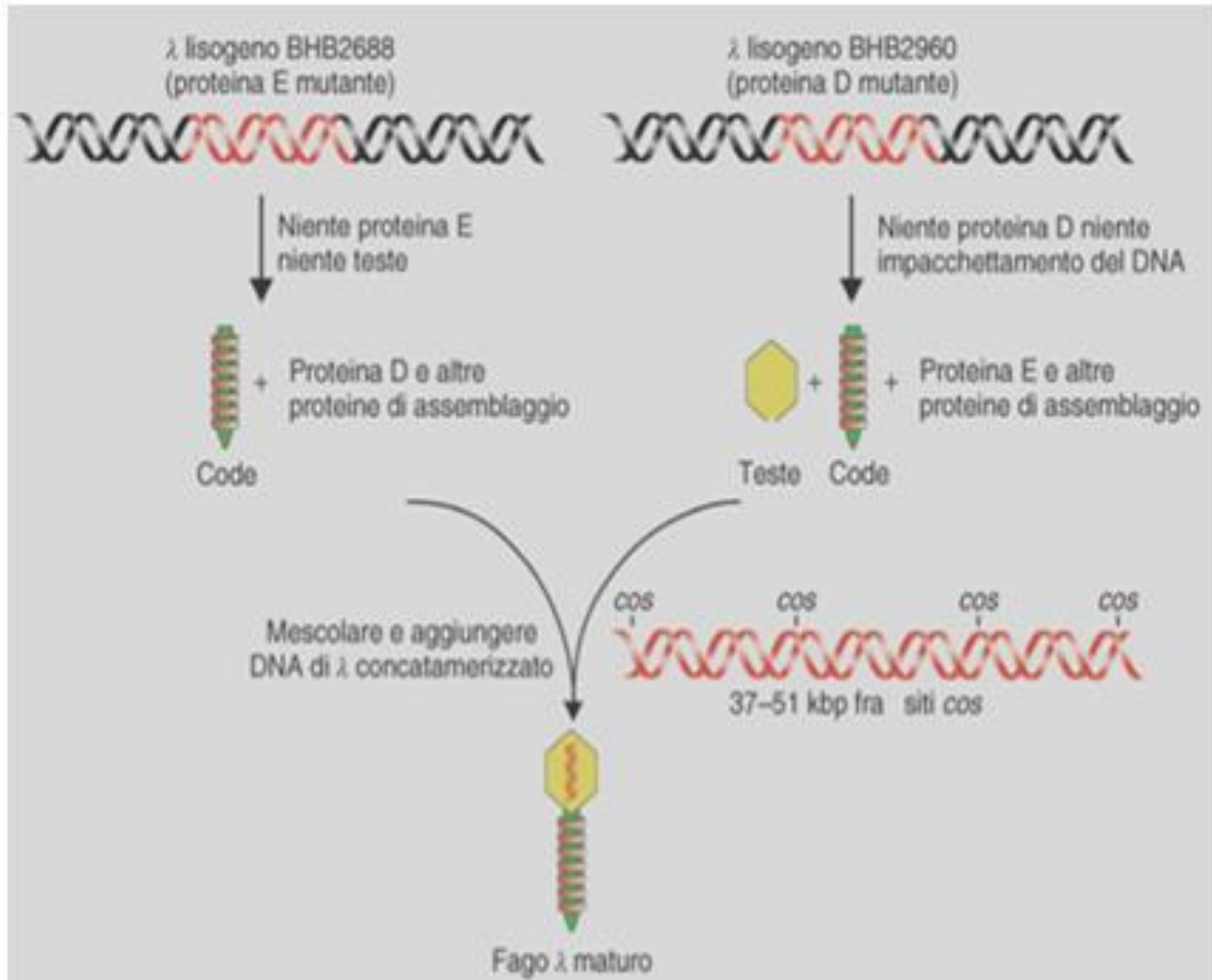
Il risultato sarà la produzione di placche di lisi, apparentemente simili a colonie batteriche.

Per il packaging esiste:

- un **limite inferiore**, pari al **75%** del genoma di λ (circa 37 Kbp, al di sotto il DNA non viene impaccato e il fago non è vitale)
- un **limite superiore**, pari al **105%** della lunghezza del suo DNA (circa 51 Kbp)

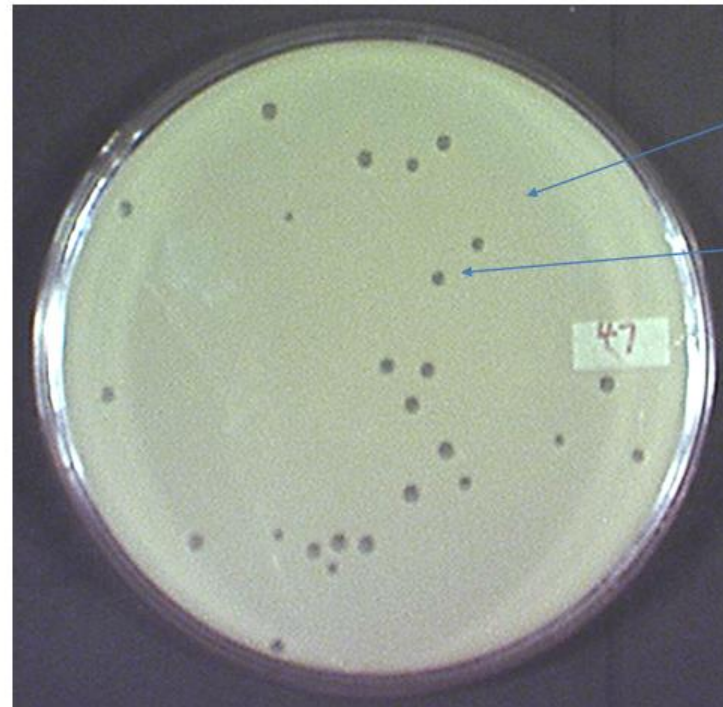
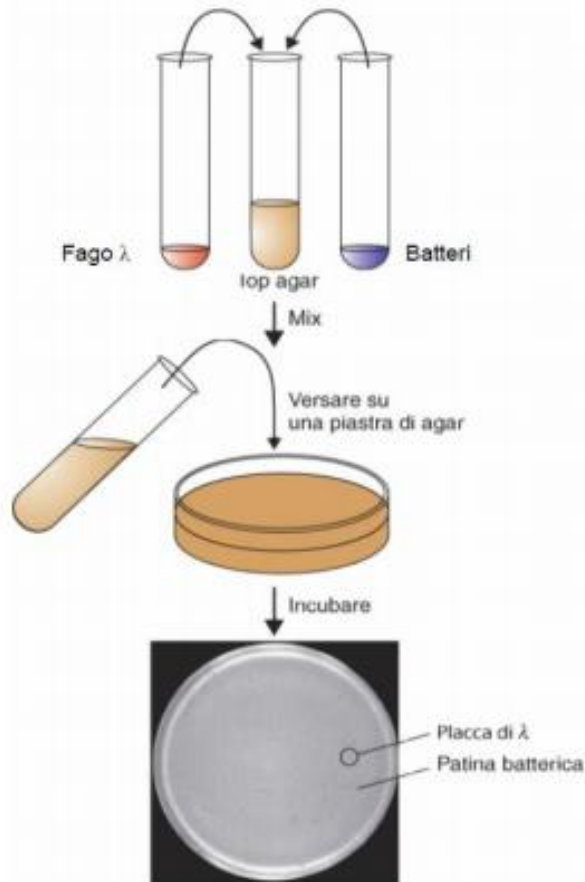
Packaging *in vitro*

- ceppo BHB2690, mancante della proteina D necessaria per DNA packaging
- ceppo BHB2688, mancante della proteina E, necessaria per le teste,



In laboratorio, per la replicazione e la crescita del fago λ , il fago viene mescolato con una coltura di *E.coli* ad alta densità, in una soluzione di agar chiamata top agar e la soluzione viene versata sulla superficie di una piastra di coltura ed incubata a 37° C. La crescita di λ produce la lisi delle cellule batteriche e viene visualizzata come placche di lisi.

I batteriofagi si presentano come placche di lisi su popolazioni batteriche cresciute a confluenza su terreni solidi. **Ogni placca rappresenta un clone.**

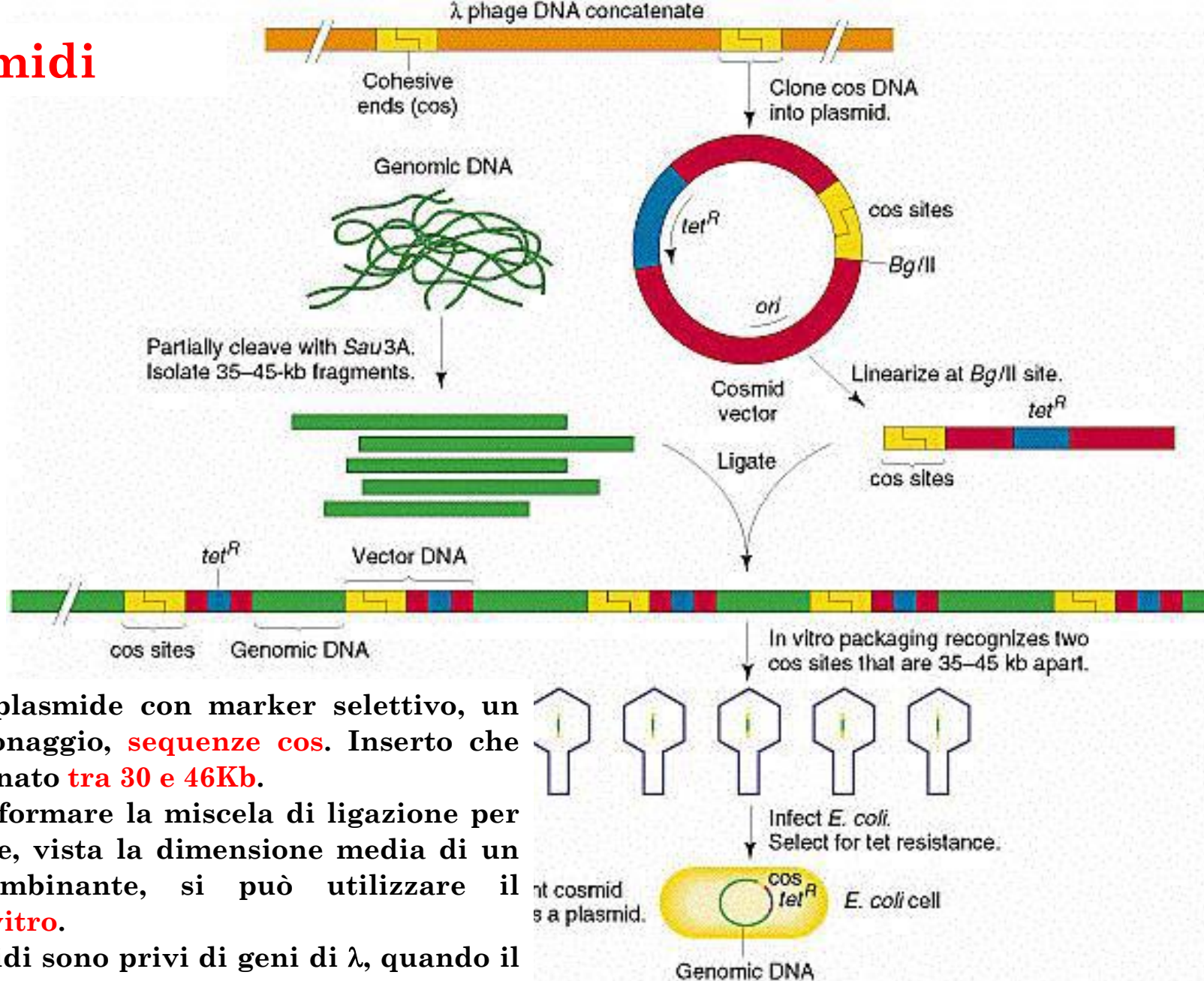


E-coli
(confluent)

Plaque:

- Initiated by 1 phage
- Plaque contains millions of phages
- Phages can be isolated and further amplified

Cosmidi



Un cosmide, plasmide con marker selettivo, un *ori*, siti di clonaggio, **sequenze cos**. Inserto che può essere clonato **tra 30 e 46Kb**.

Invece di trasformare la miscela di ligazione per trasformazione, vista la dimensione media di un cosmide ricombinante, si può utilizzare il **packaging in vitro**.

Poiché i cosmidi sono privi di geni di λ , quando il DNA si trova nelle cellule di *E.coli* viene mantenuto come plasmide

Vettori di clonaggio eucariotici: vettori per lievito

I lieviti sono molto utilizzati come organismo ospite perchè, pur essendo unicellulari, sono organismi eucariotici.

In generale esistono 2 tipi di vettori in lievito: i **vettori d'integrazione**, che non possono replicare e vengono mantenuti per integrazione nel cromosoma dell'ospite e i **vettori a replicazione autonoma**, che invece possono replicarsi autonomamente.

Vettori di integrazione

Un tipico vettore d'integrazione, chiamato **YIp (Yeast Integrative plasmid)** è basato su un vettore plasmidico entro il quale si clona la sequenza d'interesse. Una volta trasformato in lievito il plasmide verrà **mantenuto solo dopo integrazione in un cromosoma** mediato dalla **ricombinazione omologa** tra un **marcatore funzionale** di lievito e il corrispondente **marcatore difettivo** in un lievito mutante

Vettori autonomi

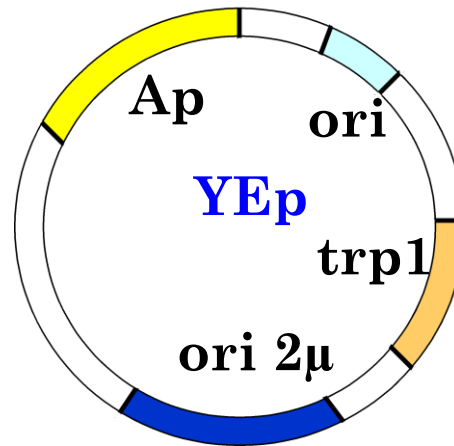
I vettori a replicazione autonoma assicurano **alte frequenze di trasformazione**.

YEp (Yeast Episomal plasmid): basati su un plasmide endogeno di lievito di tipo episomale, il **plasmide 2 μ** .

YCp (Yeast Centromere plasmid) e **YAC (Yeast Artificial Chromosome)**: plasmidi con sequenze **ARS (Autonomous Replicating Sequence)** come centromeri o telomeri

Marcatori di selezione dei vettori di lievito

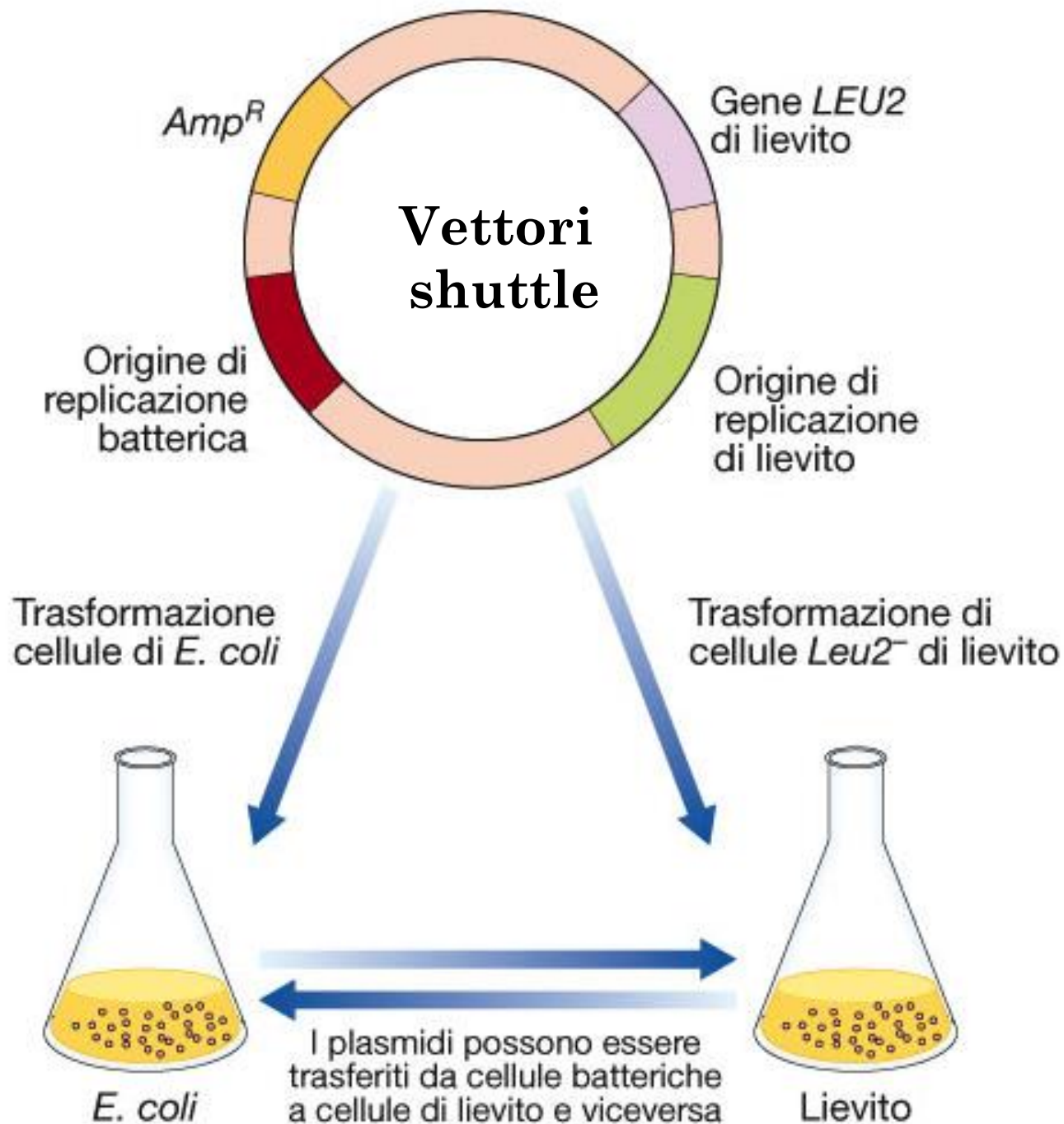
la selezione viene effettuata sfruttando la complementazione di mutazioni auxotrofiche nel ceppo di lievito ospite



Per esempio, un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* contenente una mutazione nel gene **trp1** non sarà in grado di crescere su un terreno privo di triptofano. Se, però, il vettore plasmidico porta un gene **trp1** funzionale, i trasformanti potranno crescere selettivamente su terreni privi di triptofano.

Tra i marcatori più comunemente impiegati, oltre a **trp1**, **ura3** (uracile), **leu2** (leucina) e **his3** (istidina).

B



YAC

Nel caso di genomi grandi e complessi, come quelli dei mammiferi o delle piante superiori, non è opportuno utilizzare genoteche cosmidiche o, ancor meno fagiche o plasmidiche. Il numero di cloni necessari per “coprire” statisticamente questi genomi sarebbe troppo grande.

Il metodo utilizzato quindi consiste nel suddividere il genoma in frammenti molto più grandi, utilizzando appositi vettori come gli **YAC (Yeast Artificial Chromosome)**

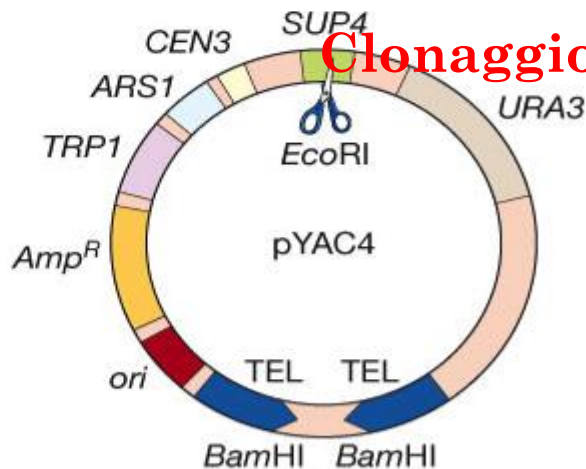
I vettori YAC possono accettare inserti grandi fino a **0,5-2Mb**, anche se l'efficienza di trasformazione è molto bassa. Vengono mantenuti e propagati in E.coli

Uno YAC è costituito essenzialmente da:

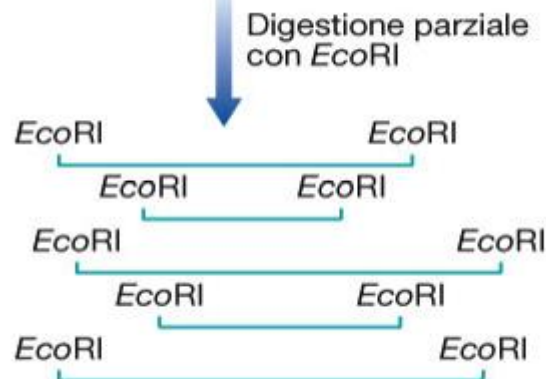
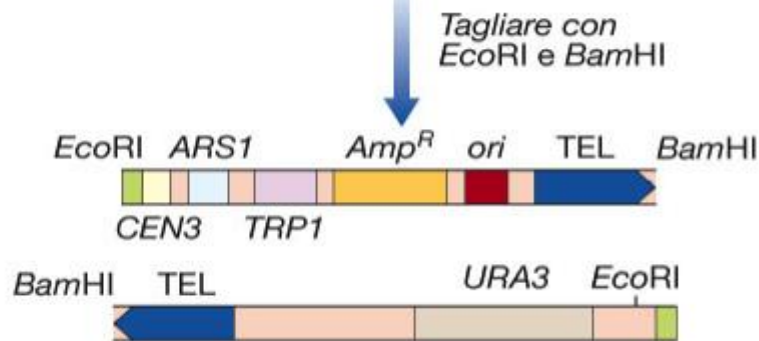
- **un centromero di lievito**
- **due telomeri di lievito**
- **un' origine di replicazione di lievito (ARS)**
- **uno o più siti unici per enzimi di restrizione**
- **un marcatore di selezione (di tipo auxotrofico)**

Clonaggio in vettori YAC

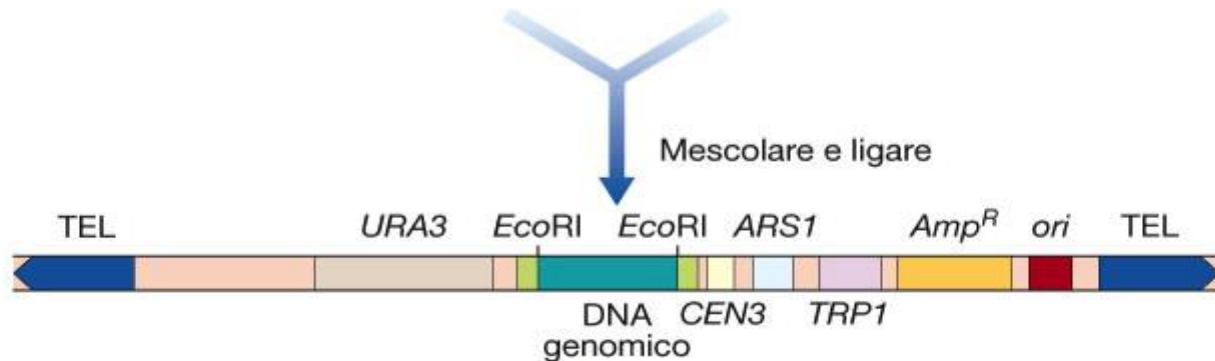
A



B



C



Trasformazione in cellule di lievito Ade-, Ura-, Trp-
e selezione per colonie rosse, URA+, TRP+

S.cerevisiae *ura⁻*, *trp⁻*, *ade⁻* a causa di mutazione *ochre* accumula pre-metabolita dell'adenina → **colonie rosse**

YAC con gene **SUP 4** = gene per il tRNA con UAA Tyr*

SUP 4 integro sopprime la mutazione non senso "ochre" nel gene **ADE2** del ceppo di lievito: viene sintetizzata adenina, non c'è accumulo di pre-metabolita rosso → colonie bianche

S. cerevisiae (terreno minimo) + YAC senza inserto (SUP attivo) → colonie bianche

S. cerevisiae (terreno minimo) + YAC con inserto (SUP inattivo) → **colonie rosse**

Cellula di lievito ospite AB1380 con gene mutato Ade-2

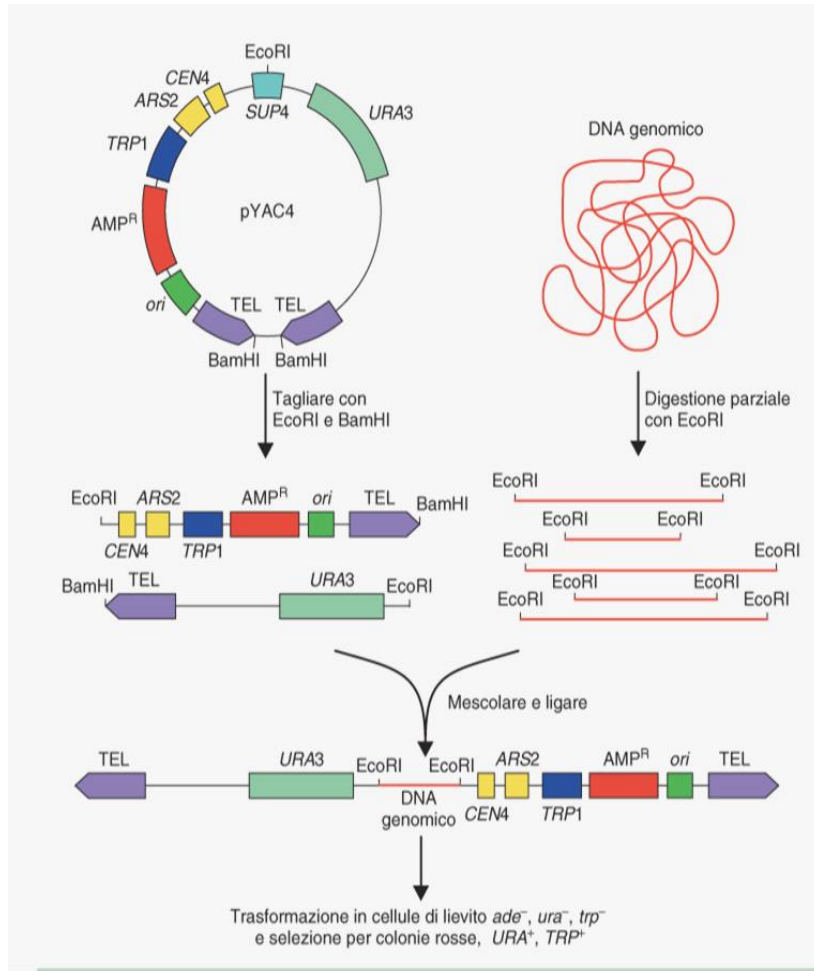
↓↓

colonie rosse (fenotipo mutante)

L'introduzione di uno YAC con il gene SUP4 intatto (senza inserto) sopprime la mutazione *ade-2* e dà colonie incolore

L'introduzione di uno YAC con il gene SUP4 interrotto dal DNA clonato ripristina il fenotipo mutante e dà colonie rosse

Clonaggio in un vettore YAC



Il vettore è tagliato con enzimi di restrizione per produrre due braccia ciascuna con un telomero all'estremità.

Un braccio contiene:

- Sequenza ARS1
- Centromero CEN4
- Marcatore selettivo *trp1*

L'altro braccio contiene:

- Marcatore selettivo *ura3*

Il DNA esogeno inattiva il gene SUP4 (tRNA soppressore)

Vettori non ricombinanti daranno l'espressione di SUP4 con formazione di colonie bianche

vettori ricombinanti in cui il gene è stata inattivato per inserimento di DNA esogeno avremo colonie rosse

Gli YAC ricombinanti vengono trasformati in un ceppo di lievito

Ura3⁻, *trp1*⁻ e *ade2*⁻

I ricombinanti vengono identificati come colonie rosse che crescono in terreno privo di uracile e triptofano

Ade2-fosforibosilamino-imidazolo-carbossilasi mutata

↓ SUP4

Colonie bianche
Non Ricombinanti

↓ ~~SUP4~~

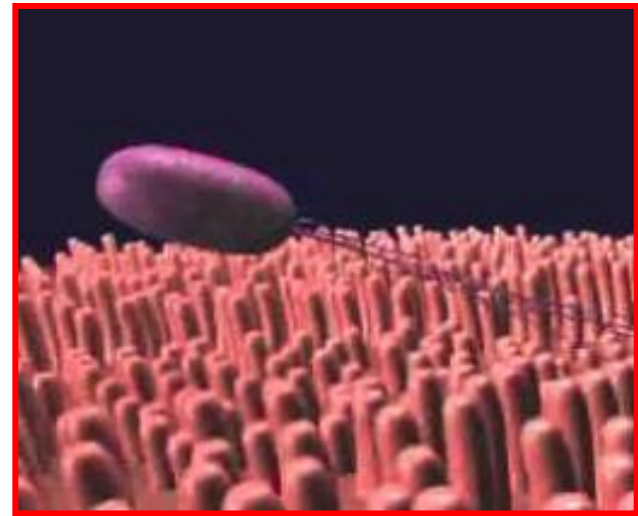
Colonie rosse
Ricombinanti

5 dei sistemi di clonaggio utilizzati per costruire le mappe per sequenziare il genoma umano

	Vettore	Dimensione del DNA genomico parzialmente digerito	Clone a grande inserto	Numero di copie	Numero di cloni con una copertura umana 1X
Cosmide	<p>SITO COS Polilinker Origine di replicazione di un plasmide multicopia Amp^R</p>	35-45 kb	<p>L'inserto di DNA umano costituisce circa l'80% del cosmide</p>	50-100	~75 000
Fosmide	<p>Amp^R SITO COS Polilinker Origine di replicazione del fattore F Cam^R</p>	35-45 kb	<p>L'inserto di DNA umano costituisce circa l'80% del fosmide</p>	Singola copia	~75 000
BAC	<p>Cam^R Polilinker Origine di replicazione del fattore F Amp^R</p>	100-200 kb	<p>L'inserto di DNA umano costituisce circa il 90% del BAC</p>	Singola copia	15 000-30 000
PAC	<p>Kan^R lox Polilinker Origine di replicazione del fago P1 Amp^R</p>	100-200 kb	<p>L'inserto di DNA umano costituisce circa il 90% del PAC</p>	Singola copia	15 000-30 000
YAC	<p>Amp^R Telomero SITO di linearizzazione Centromero Marcatore selezionabile 2 Origine di replicazione SITO di clonaggio Marcatore selezionabile 1</p>	~200-1000 kb	<p>Inserto di DNA umano Tel M1 Ori Cen M2 Tel</p>	Singola copia	~3000-15 000

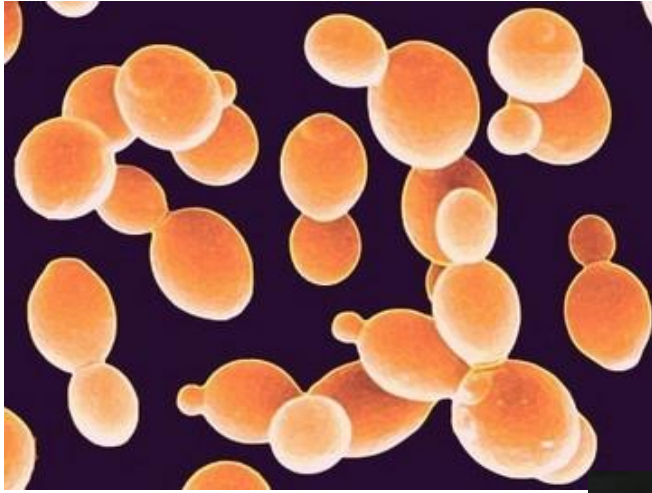
Il Primo Modello

Escherichia coli



Il Primo Organismo Modello eucariote

Saccharomyces cerevisiae

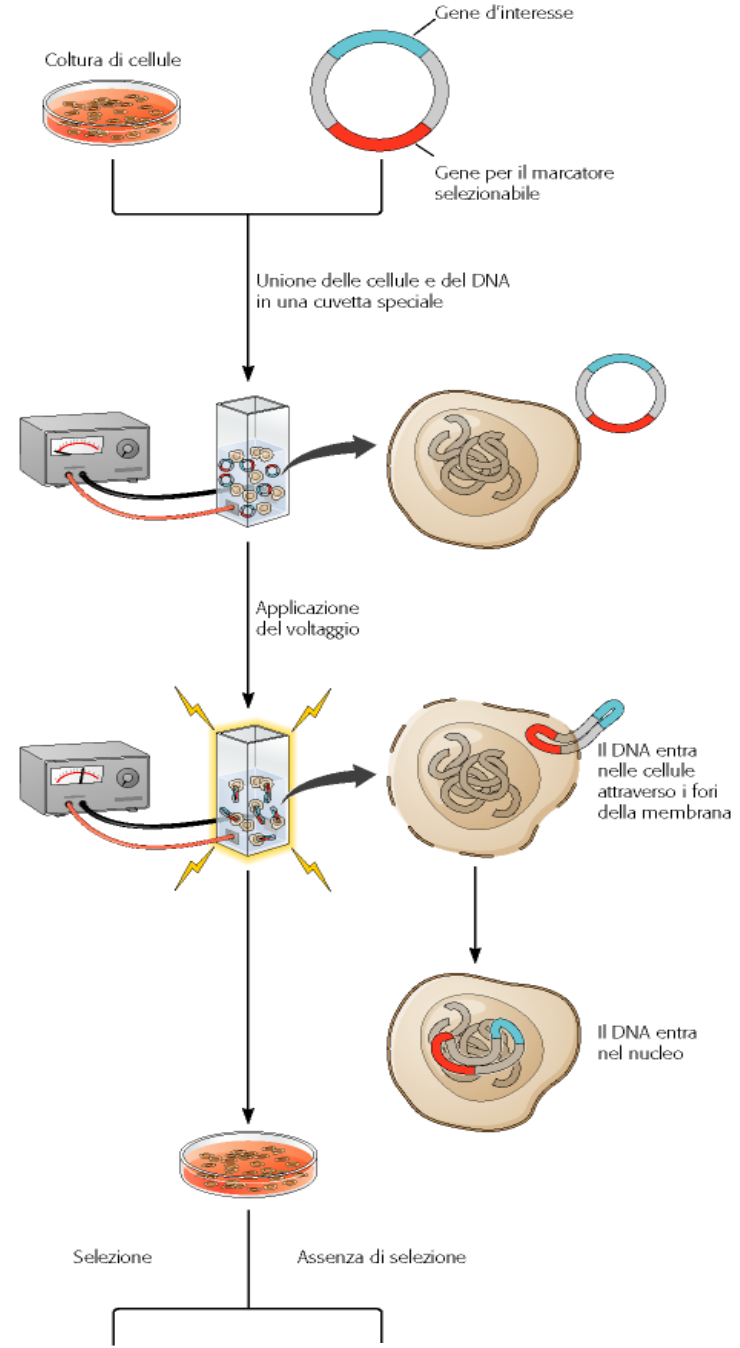


Trasferimento genico mediante elettroporazione

Le cellule, in una sospensione acquosa ad alta concentrazione, vengono incubate con il DNA e poste in una piccola cella con 2 elettrodi collegati ad uno speciale alimentatore. Un breve impulso elettrico, emesso tra i 2 elettrodi, induce l'apertura di piccoli fori sulla membrana cellulare.

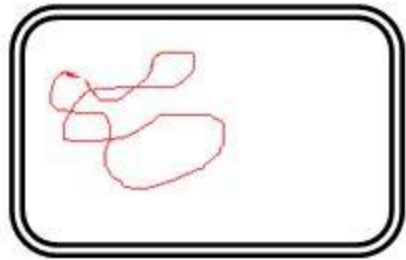
Le cellule vengono poi diluite in terreno liquido ed incubate in agitazione per almeno un'ora (recovery).

Le cellule possono essere poi utilizzate per esperimenti in transiente, o piastrate su terreno con antibiotico per selezionare i cloni positivi.

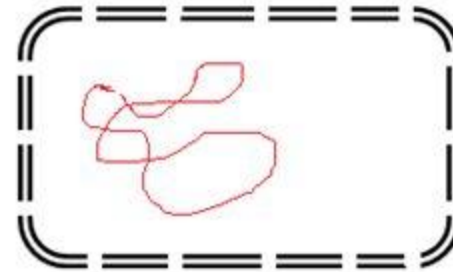


Espressione stabile Espressione transiente

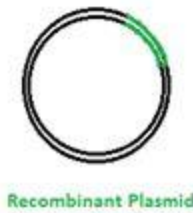
Trasferimento genico Cellule Ca competenti



1. CaCl_2 treatment
To permeabilize the
bacterial cell membrane
2. Brief heat shock
to facilitate
The DNA up take.



Competent
Bacterial cell



Recombinant Plasmid

Insertion



Transformed bacteria

Efficienza di trasformazione

- Calcolare i μg totali di DNA usati per la trasformazione
- Calcolare il fattore di diluizione usato per piastrare i trasformanti
- Contare le colonie
- Moltiplicare n.colonie (CFU) x fattore diluizione
- Dividere per i μg di DNA utilizzato

Efficienza di trasformazione CFU/ μg

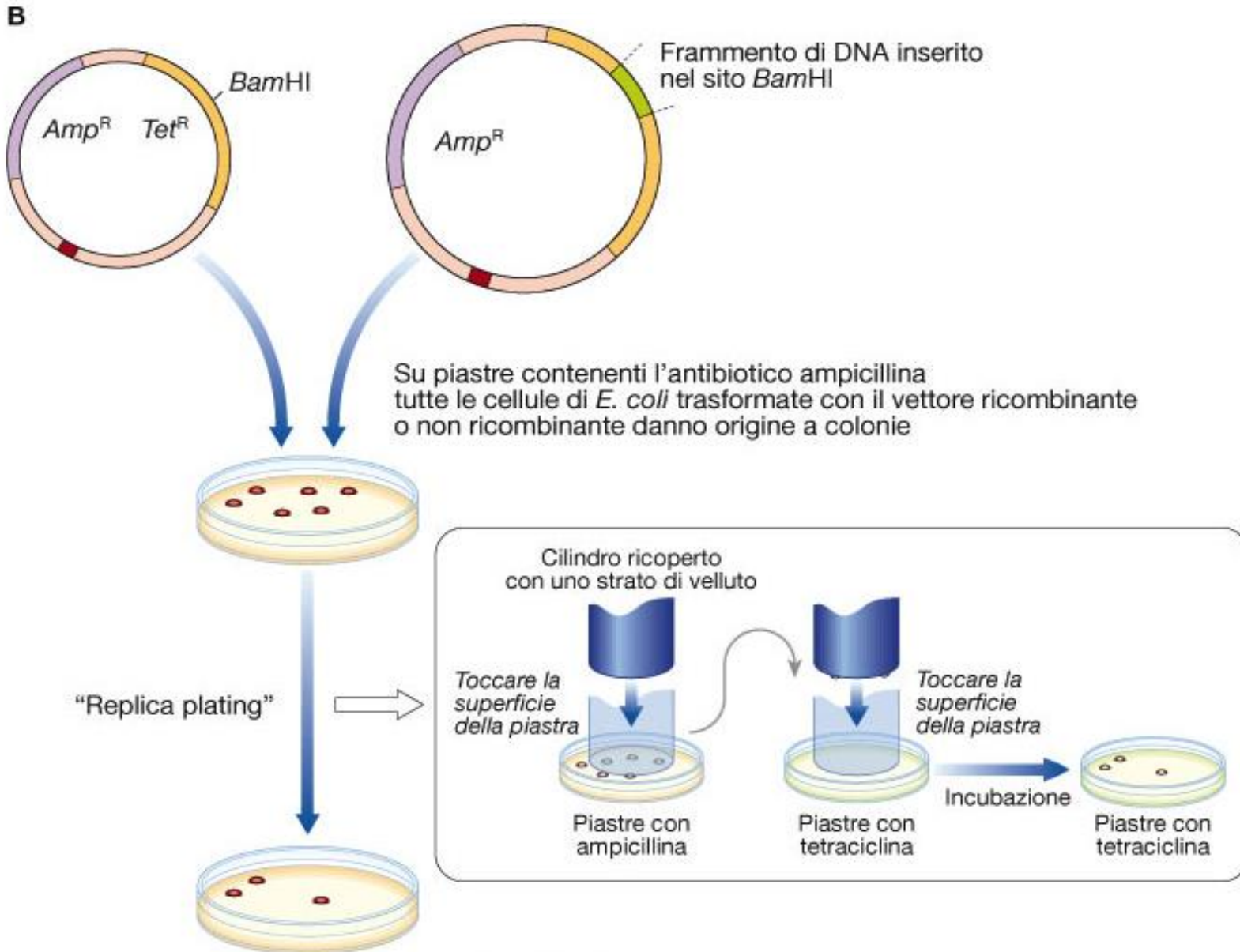
Controlli di trasformazione:

Ligazione del solo vettore

Vettore chiuso a concentrazione nota

Vettore digerito

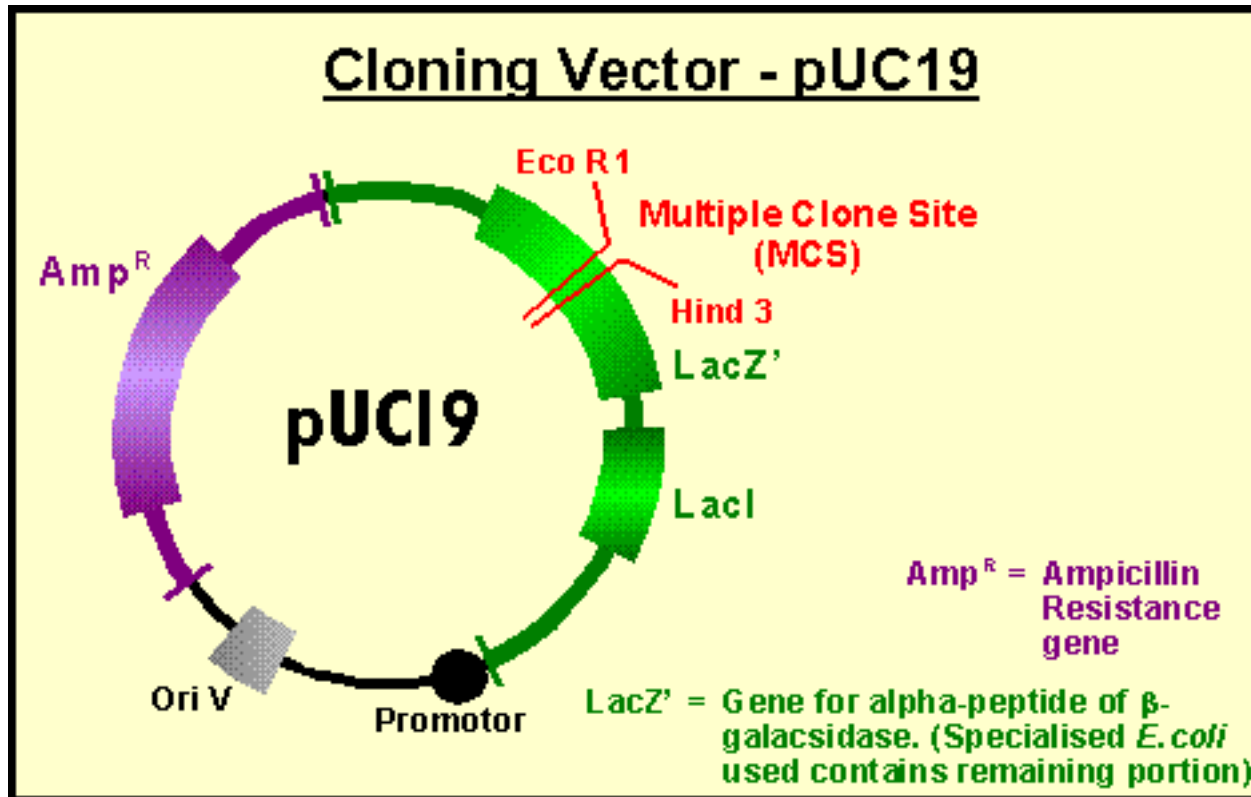
Selezione di vettori ricombinanti



Su piastre con tetraciclina crescono solo cellule di *E. coli* trasformate con il vettore non ricombinante

α -complementazione

I vettori della famiglia pUC sono piccoli, ad alto numero di copie, e tra i primi vettori caratterizzati dalla selezione detta α -complementazione o selezione bianco-blu.



α -complementazione o Selezione bianco-blu

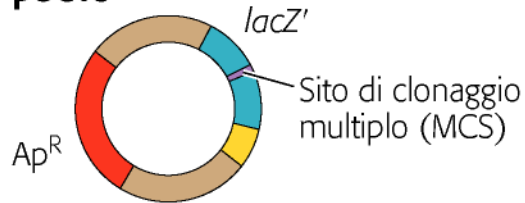
I vettori della serie pUC presentano, sotto il controllo del promotore del lattosio, un piccolo peptide, corrispondente alla parte **N-terminale della β -galattosidasi** (il prodotto genico di **lacZ**).

Questo peptide é in grado di complementare la funzionalità enzimatica della β -galattosidasi **in ceppi di E.coli mutanti privi della parte N-terminale (lacZ Δ M15)**. Utilizzando, in terreno solido, un substrato cromogenico come l' X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-Betagalattoside) l'attività enzimatica viene recuperata e le colonie appaiono colorate di **blu**.

Poiché il polylinker di pUC é situato nel gene che codifica l' α -peptide, l'inserzione di un frammento di DNA ne interrompe l'integrità funzionale e la capacità di dare α -complementazione. I cloni corrispondenti appaiono **bianchi** e corrispondono a cloni positivi.

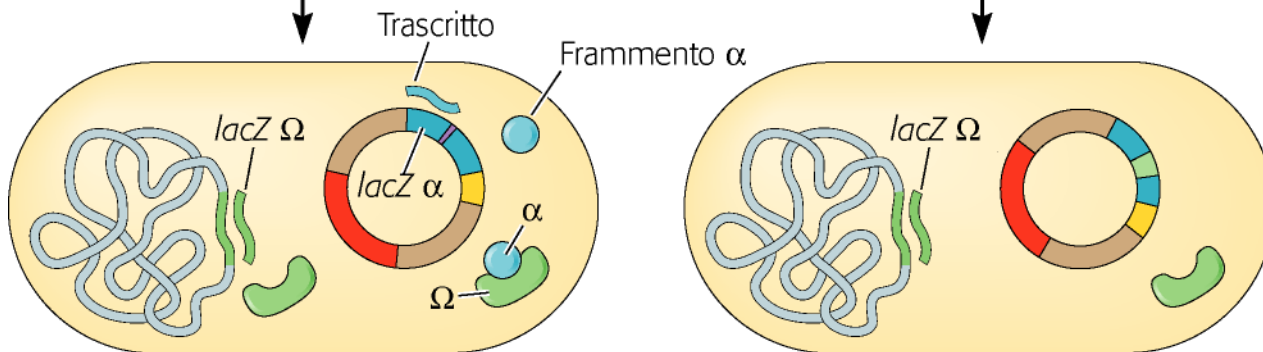
E.coli strains: F- **ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)** U169 recA1 endA1 hsdR17

pUC18



Senza inserto

Con inserto



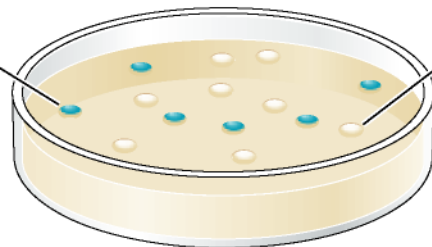
Sono prodotte entrambe le subunità di *lacZ*

È prodotto solo *lacZ* Ω

Semina su agar contenente X-gal

Colonia blu: l'enzima completo taglia X-gal

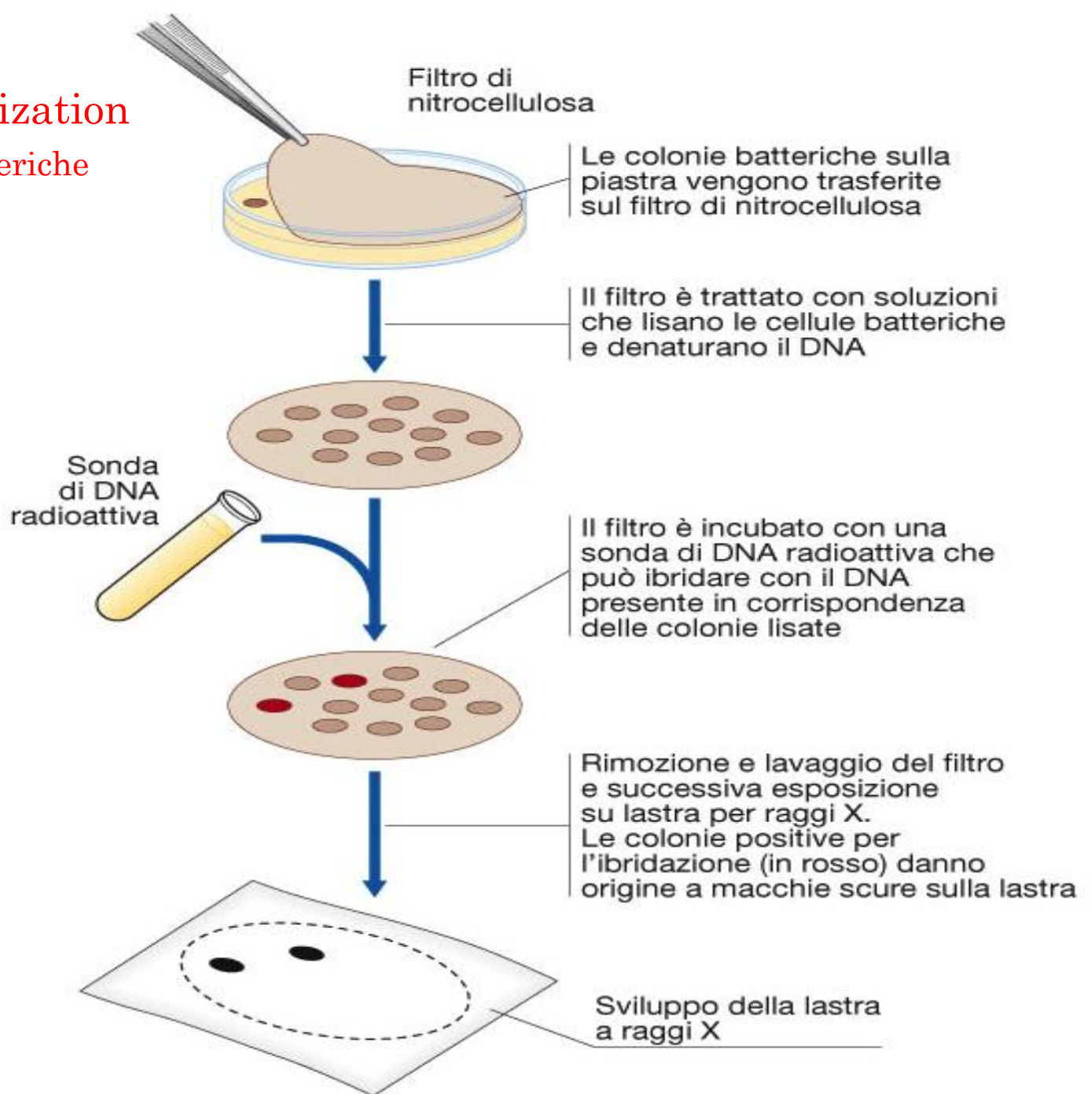
Colonia bianca: nessun taglio di X-gal





Colony hybridization

Su colonie batteriche



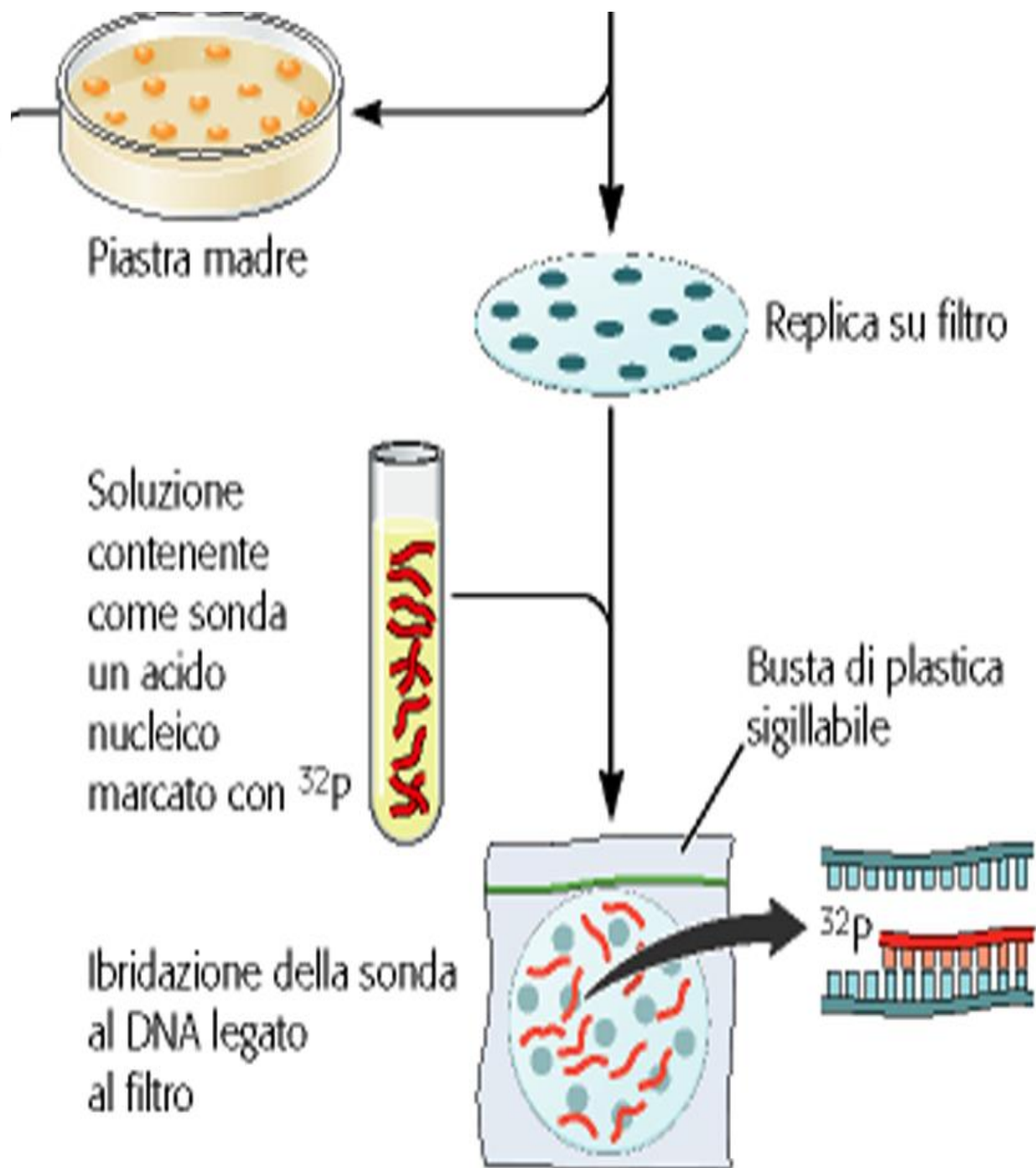
Colony hybridization

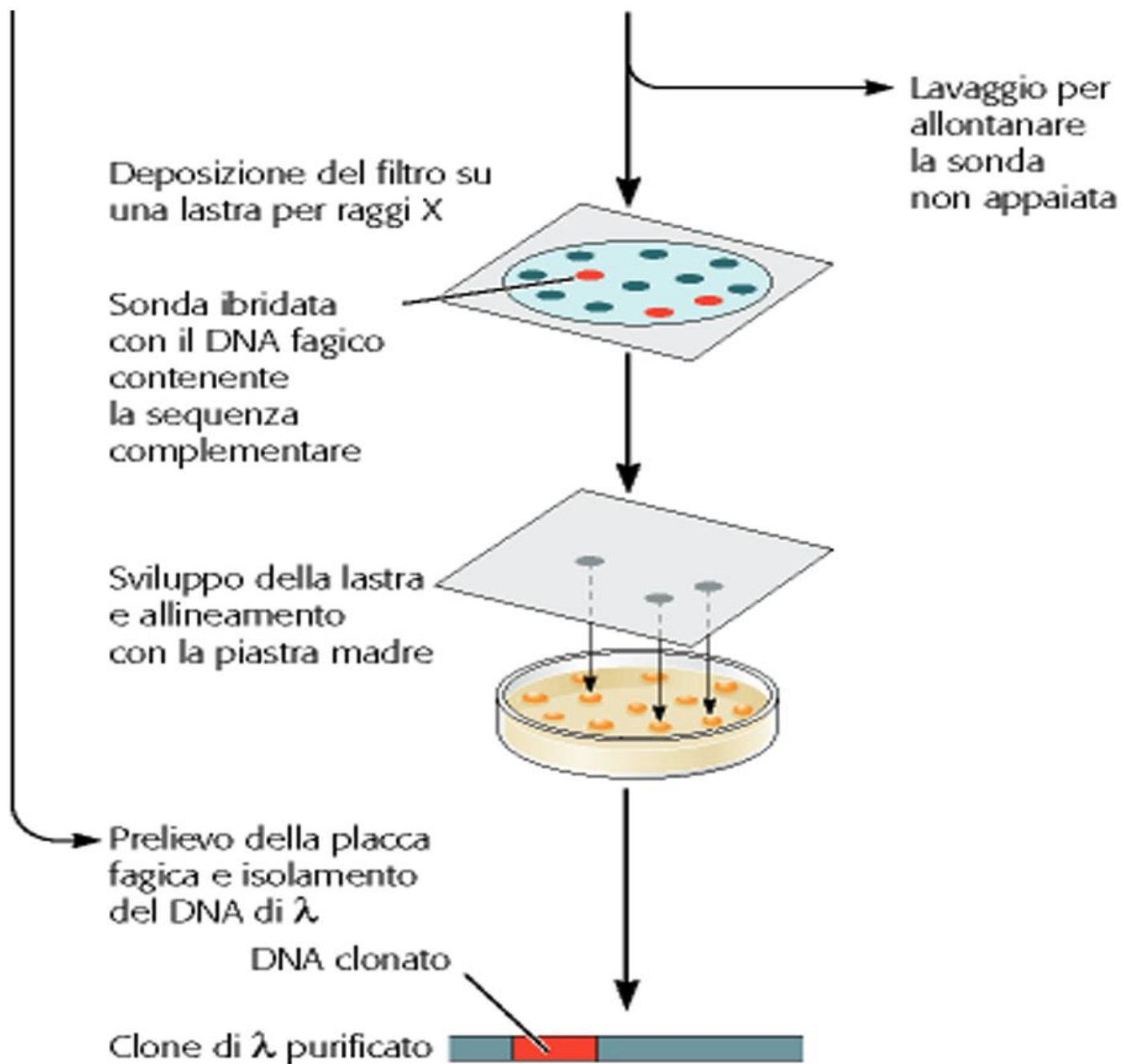
Su placche fagiche

Sovrapposizione
di un filtro di
nitrocellulosa

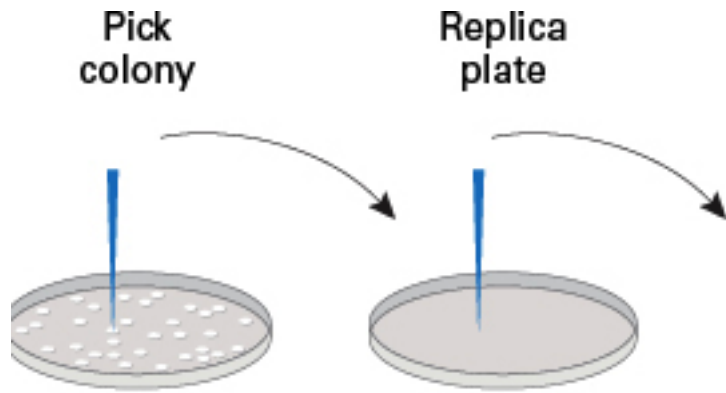
Il fago si attacca al filtro

Prelievo del filtro
dalla piastra

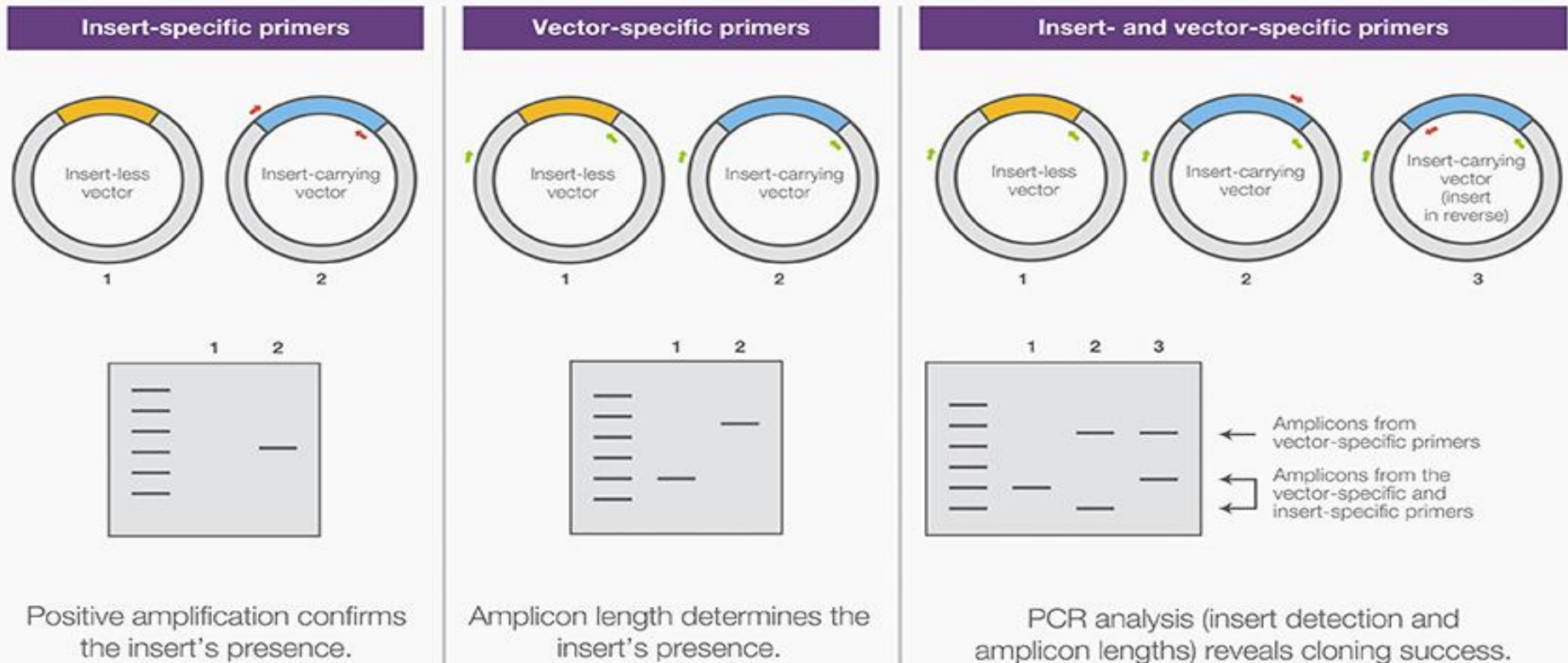




PCR su Colonia



- Si preleva qualche cellula da ogni singola colonia, la si replica su piastra e poi la si risospende in H₂O
- Si fa una reazione di PCR per ogni clone, aggiungendo alla mix di PCR qualche μ l della sospensione batterica.
- Si amplifica con **una coppia di primers specifica per l'inserto, o per il vettore**



The Gateway Cloning Strategy

The Gateway Technology is based on the bacteriophage **lambda site-specific recombination system** which facilitates the integration of lambda into the E. coli chromosome

Lambda-based recombination involves two major components:

-The DNA recombination sequences (att sites)

-The proteins that mediate the recombination reaction

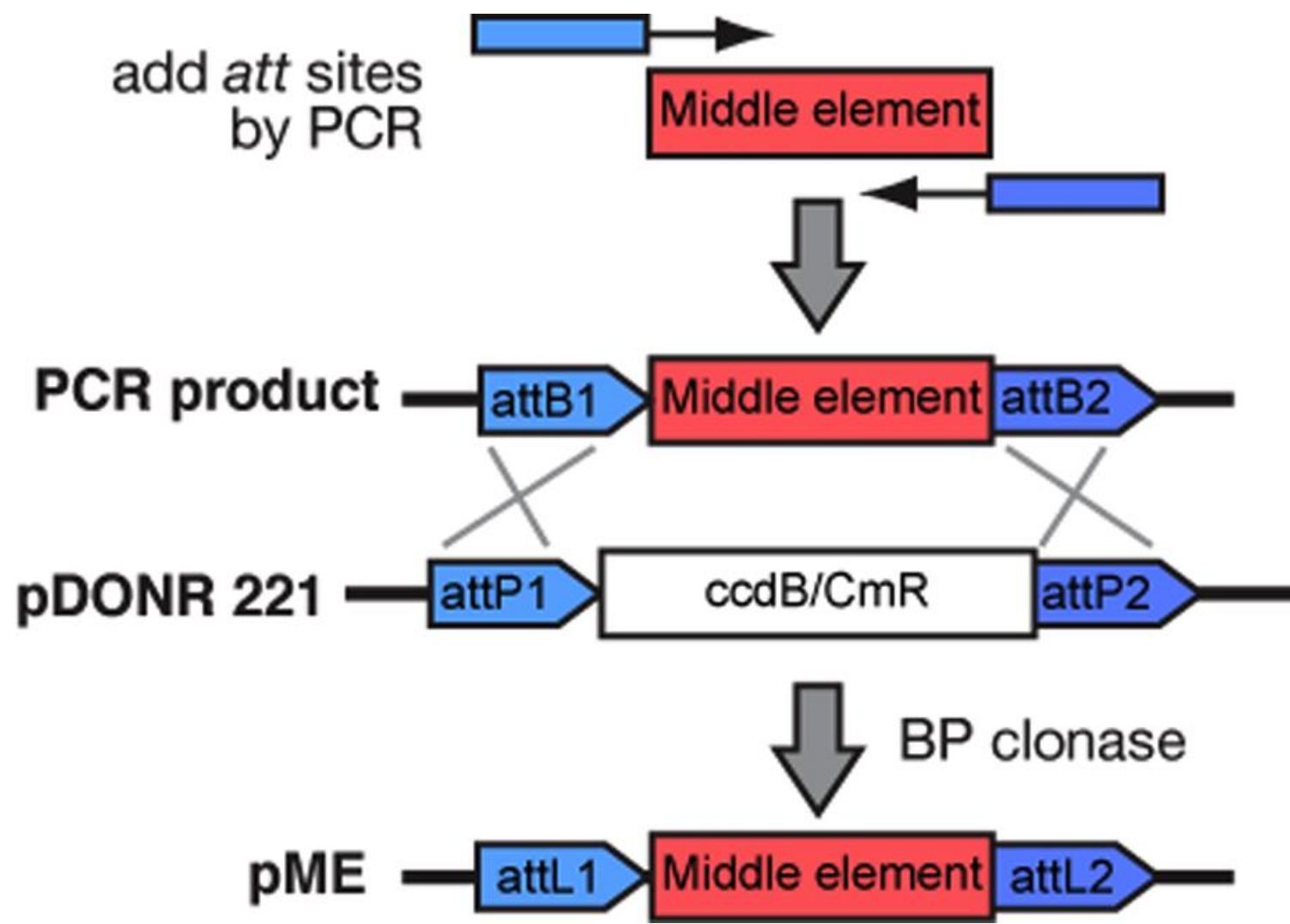
Lambda integration into the E.coli chromosome occurs via intermolecular DNA recombination that is mediated by a mixture of lambda and E.coli-encoded recombination proteins

-Recombination occurs **between specific attachment (att) sites** on the interacting DNA molecules.

- Recombination is **conservative** (i.e. **there is no net gain or loss of nucleotides**) and **does not require synthesis**.

-The DNA segments flanking the recombination sites are switched, such that after recombination, the att sites are hybrid sequences comprised of sequences donated by each parental vector

(**attL sites are comprised of sequences from attB and attP sites**)



att Sites

Lambda recombination occurs between site-specific attachment (att) sites: **attB** on the E. coli chromosome and **attP** on the lambda chromosome. The **att sites serve as the binding site for recombination proteins** and have been well-characterized. Upon lambda integration, recombination occurs between attB and attP sites to **give rise to attL and attR sites**. The actual crossover occurs **between homologous 15 bp core regions** on the two sites, but surrounding sequences are required as they contain the binding sites for the recombination proteins.

II gene ccdB

The presence of the ccdB gene allows negative selection of the donor and destination (and some entry) vectors in *E. coli* following recombination and transformation. The **CcdB protein interferes with *E. coli* DNA gyrase** thereby **inhibiting growth of most *E. coli* strains.** When recombination occurs (i.e. between a destination vector and an entry clone or between a donor vector and an attB-PCR product), the **ccdB gene is replaced by the gene of interest.** Cells that take up unreacted vectors carrying the ccdB gene or by-product molecules retaining the ccdB gene will fail to grow. This allows high-efficiency recovery of the desired clones.

attB-PCR product

GGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-----ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCCC

PCR PRODUCT

CCCCCTGTTCAAACATGTT TT TT CGTCCGA-----TGGGTCGAAAGAACATGTTTCACCAGGGGG

attB1

attB2

X

Donor Vector

Vector--N75-CCAACCTTTGTACAAAAAAGCTGAAC-N100-----N100-GTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGG-N75---Vector

ccdB-CmR

Vector--N75-GGTTGAAACATGTTTTTTCGACTTG-N100-----N100-CAAGTCAAAGAACATGTTTCAACC-N75---Vector

attP1

attP2



BP Clonase

Entry clone

Vector--N75-CCAAC TTT **GTACAAAAAAGCTAGGCT**-----**ACCCAGCTTT**CTTGTACAAAGTTGG-N75---Vector

PCR PRODUCT

Vector--N75-GGTTGAAACATGTTT **TTTCGTCCGA**-----**TGGGTCGAAAGAACATG**GTTTCAACC-N75---Vector

attL1

attL2

+

By-product

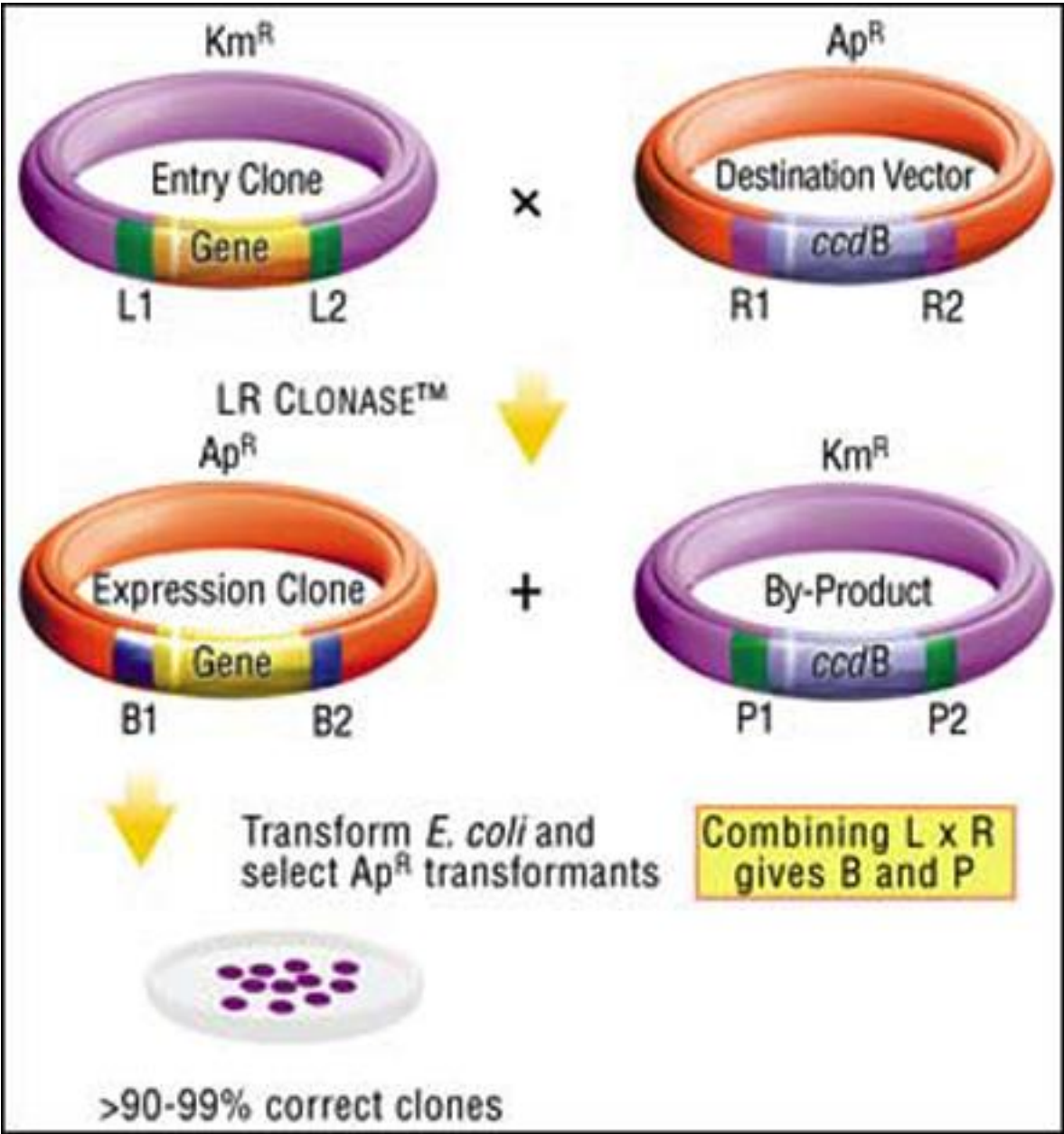
GGGGGACAAGTTT **GTACAAAAAAGCTGAAC**--N100-----N100--**ACCCAGCTTT**CTT **GTACAAAGTGGTCCCC**

ccdB-CmR

CCCCCTGTTCAAACATGTT TT TTCGACTTG-N100-----N100--**TGGGTCGAAAGAACATGTTT**CACCAGGGGG

attR1

attR2

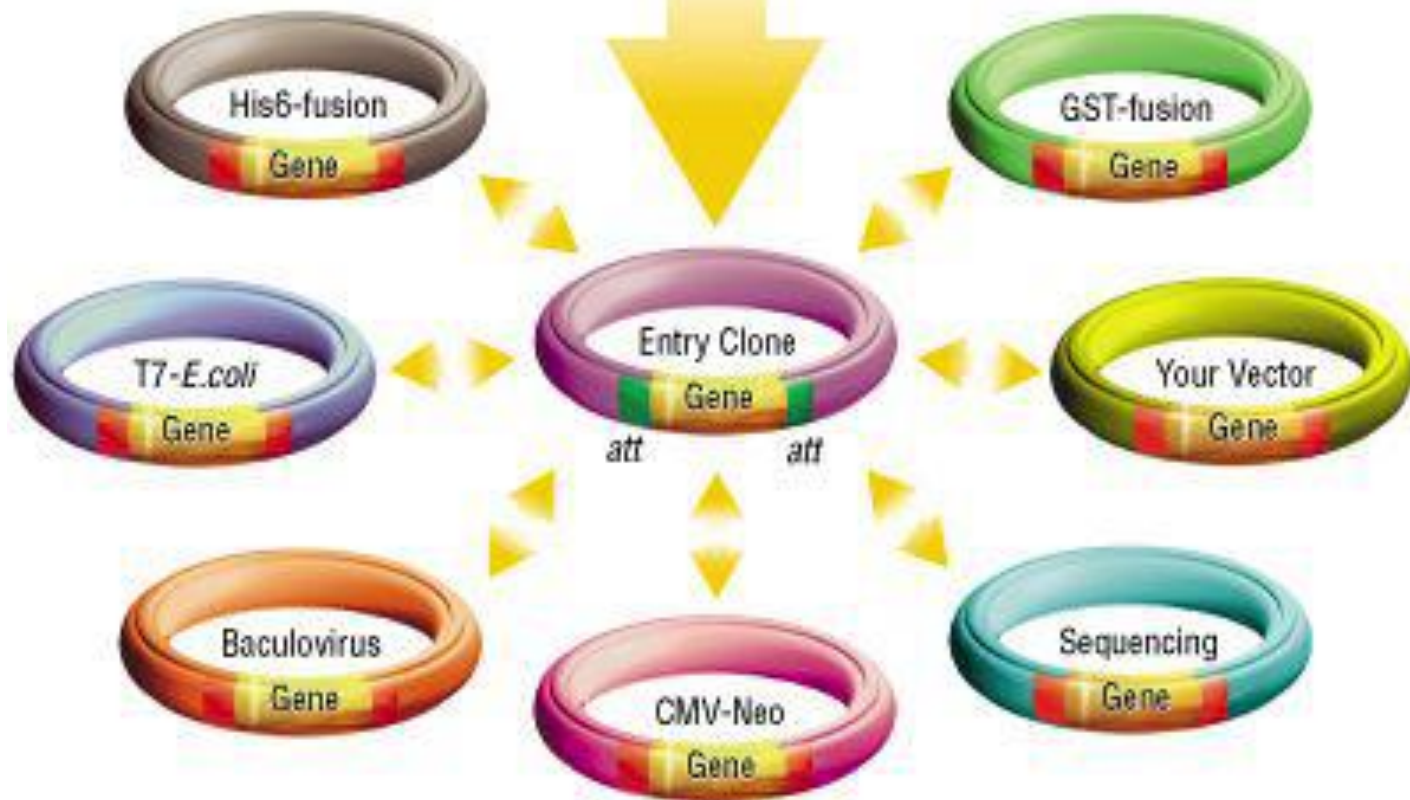


DNA fragments from:

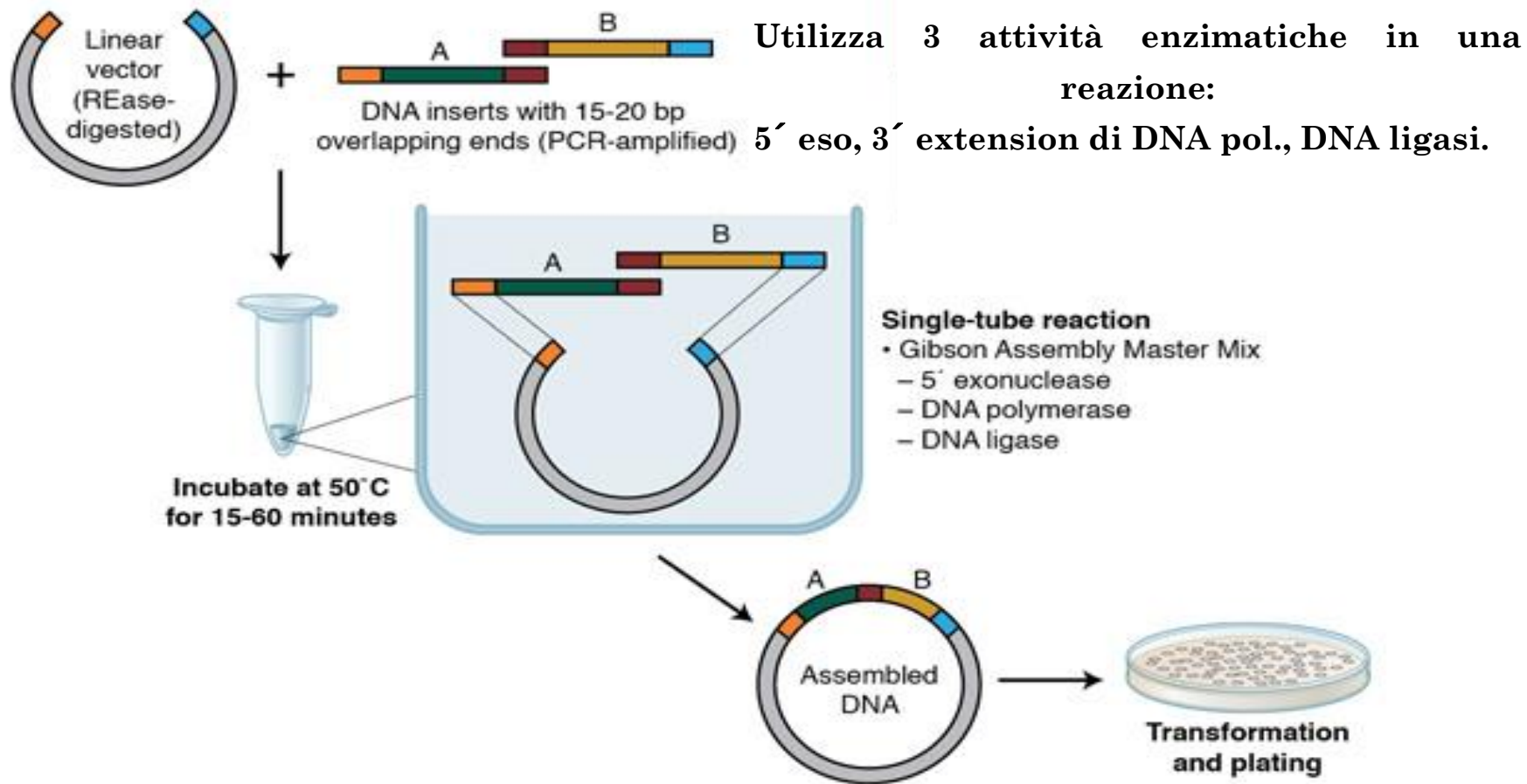
Restriction Endonuclease
Digestion and Ligation

Polymerase
Chain Reaction

cDNA Library



Gibson Assembly Method utilizzato per creare il 1° batterio sintetico



L'attività 5' esonucleasica digerisce le estremità al 5' esponendo così le sequenze complementari per l'annealing.

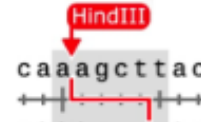
L'attività polimerasica riempie i gaps nelle regioni annilate.

La ligasi poi salda i nick e lega covalentemente i frammenti di DNA.

Golden Gate Assembly Method

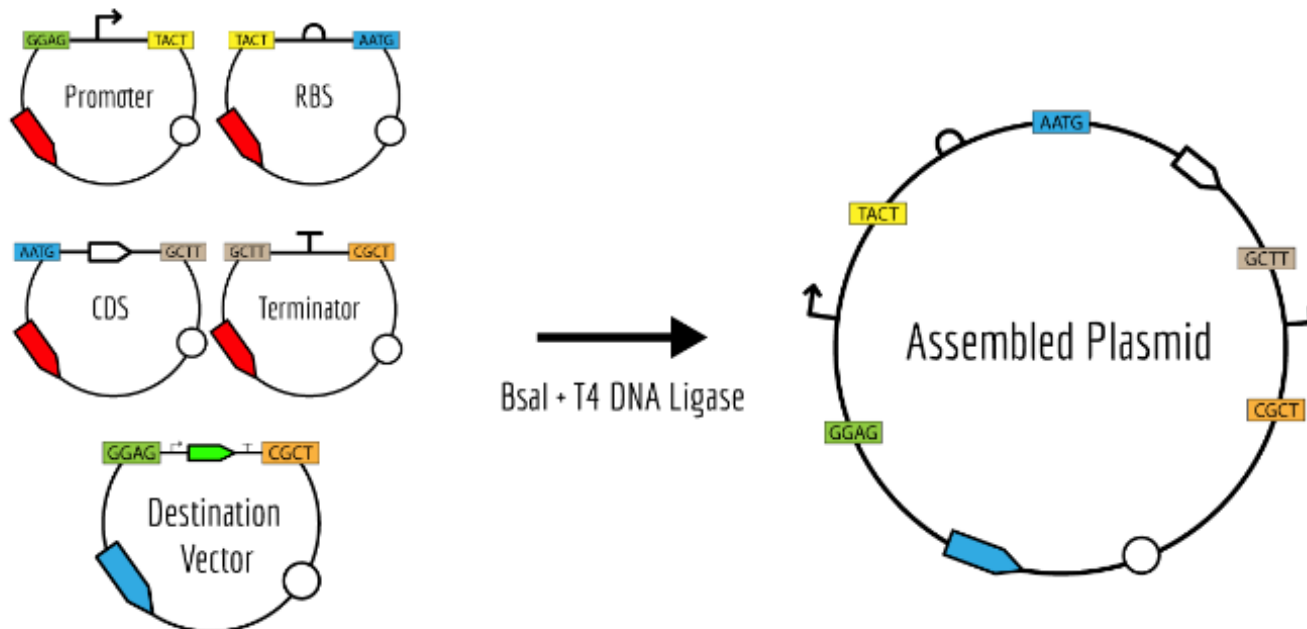
Type IIS Restriction Enzymes

- Classic **Type II** Restriction Enzymes (like HindIII)
 - Recognition sites are palindromic
 - Cut within the recognition site of the enzyme



One-pot Assembly

Assembly puts it all together

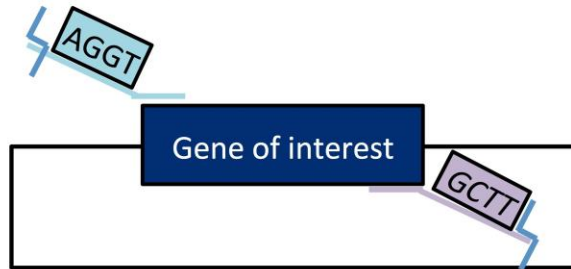


Golden Gate Assembly Method

Option 1. Gene of interest is in a Golden Gate compatible plasmid containing type IIS restriction sites (⚡)



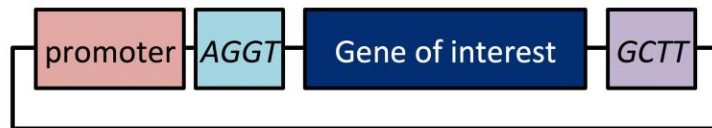
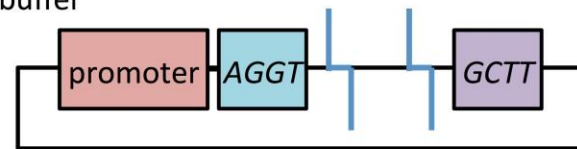
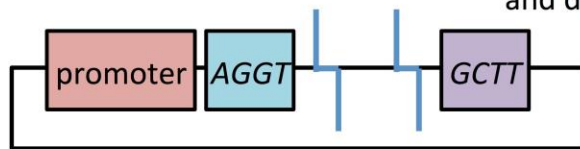
Option 2. PCR amplify gene of interest to add Type IIS sites and overhangs



+

Mix with destination vector and digestion/ligation buffer

+



Type IIS restriction sites absent from final product

Key



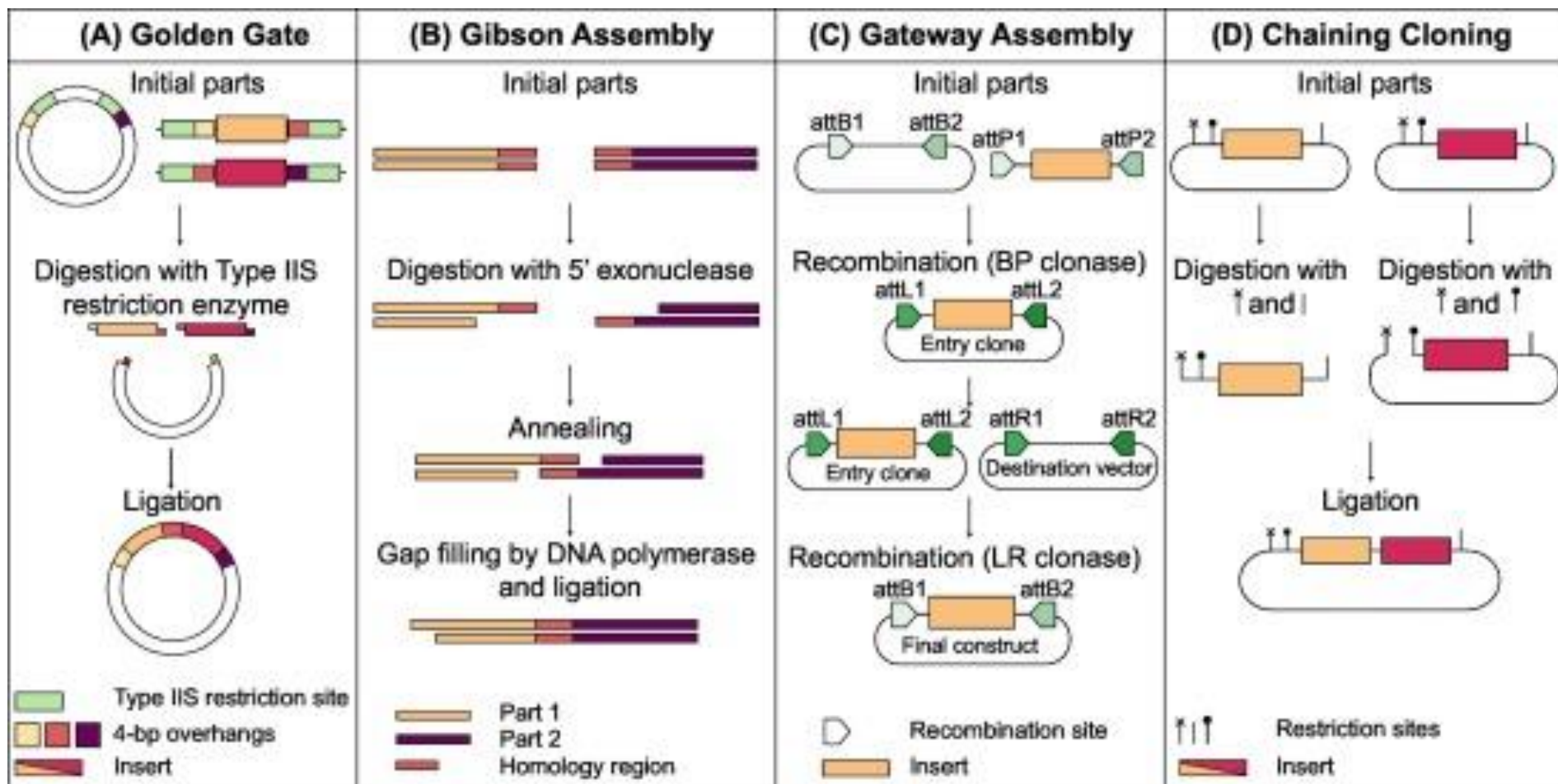
Type IIS restriction site (e.g. BbsI)



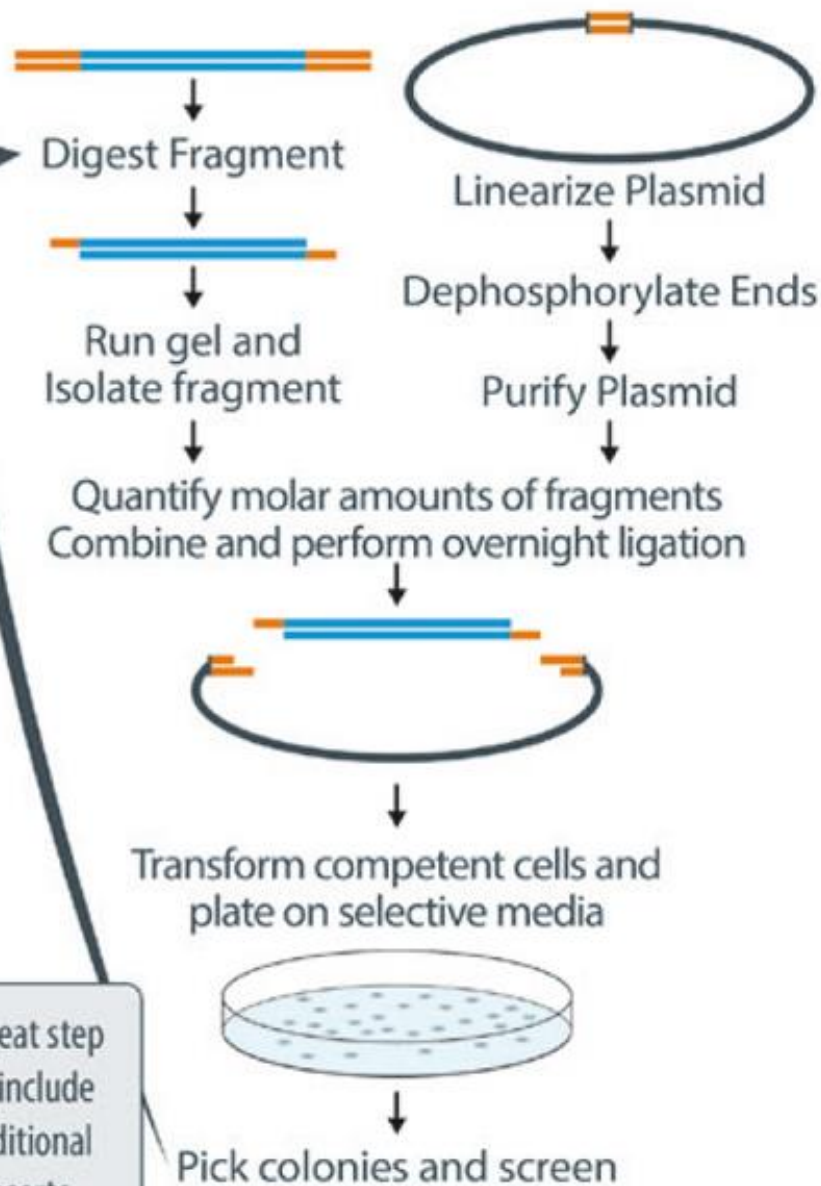
GCTT 4 base overhang



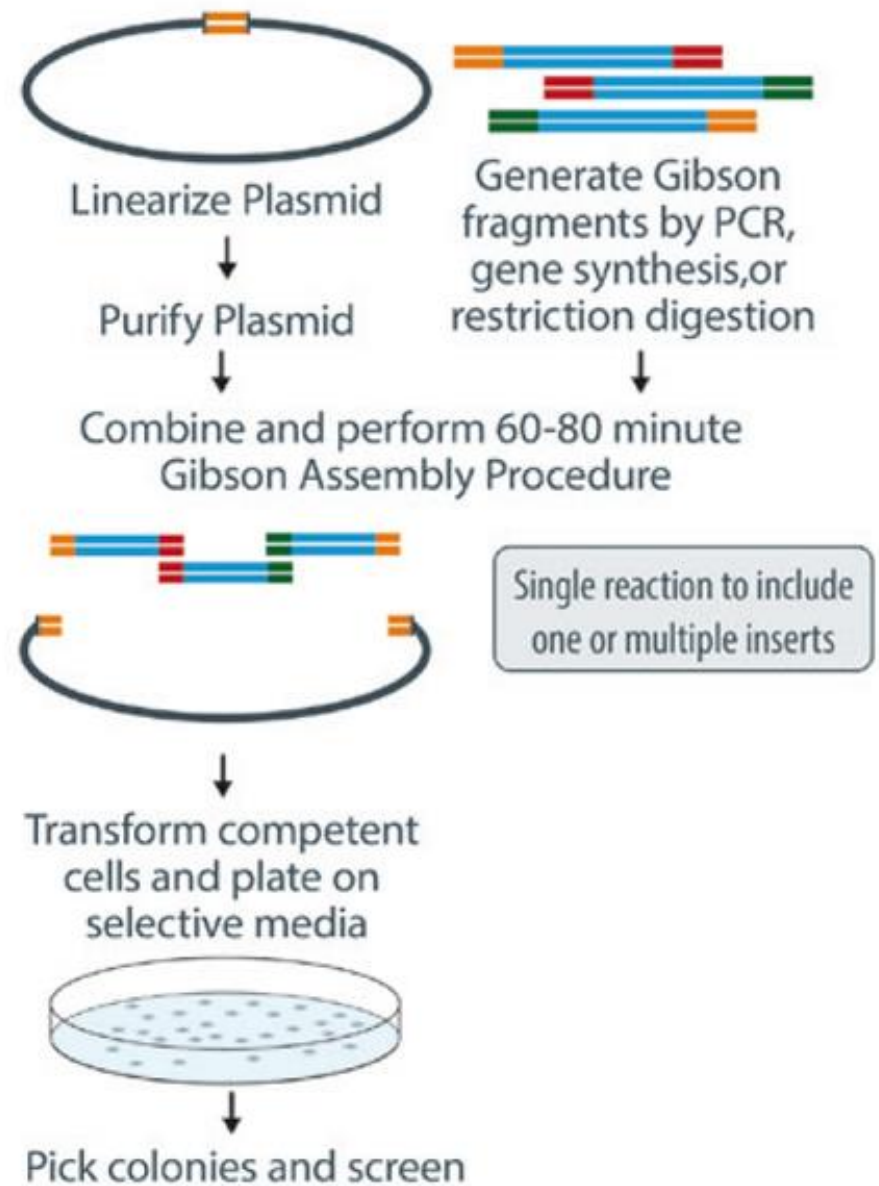
AGGT specifying directionality

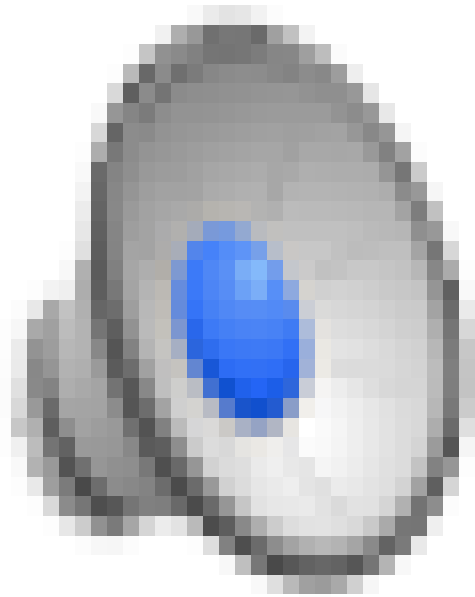


Traditional Restriction Cloning



Gibson Assembly® Method





Librerie Genomiche e di cDNA

Librerie genomiche

Rappresentano la sequenza completa di un organismo

Necessarie per il sequenziamento del genoma

Si utilizzano vettori con capacità maggiori tanto più grande è il genoma d'interesse

Si producono da qualsiasi tessuto/organo/stadio di sviluppo

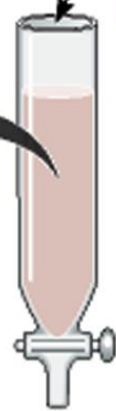
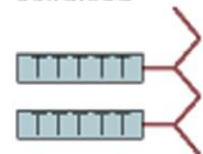
Librerie di cDNA

Riflettono le proteine espresse in un certo tessuto, o stadio di sviluppo, o condizione di crescita

Rappresentano un'istantanea del genoma completo (trascrittoma) di un organismo

Purificazione di mRNA

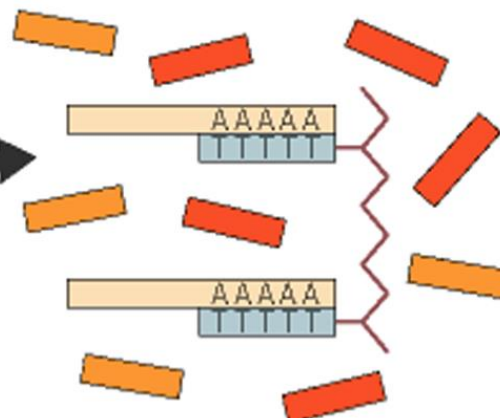
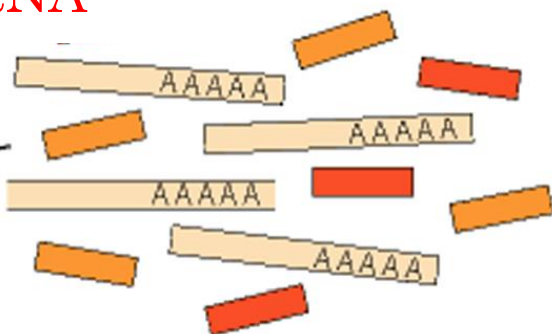
Oligo(dT)
cellulosa



L'mRNA poli(A)
si ibrida
con l'oligo(dT)

100 mM NaCl

A cellulare totale



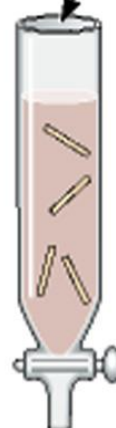
100 mM NaCl



L'rRNA e il tRNA si staccano
e vengono eliminati



10 mM Tris
1 mM EDTA



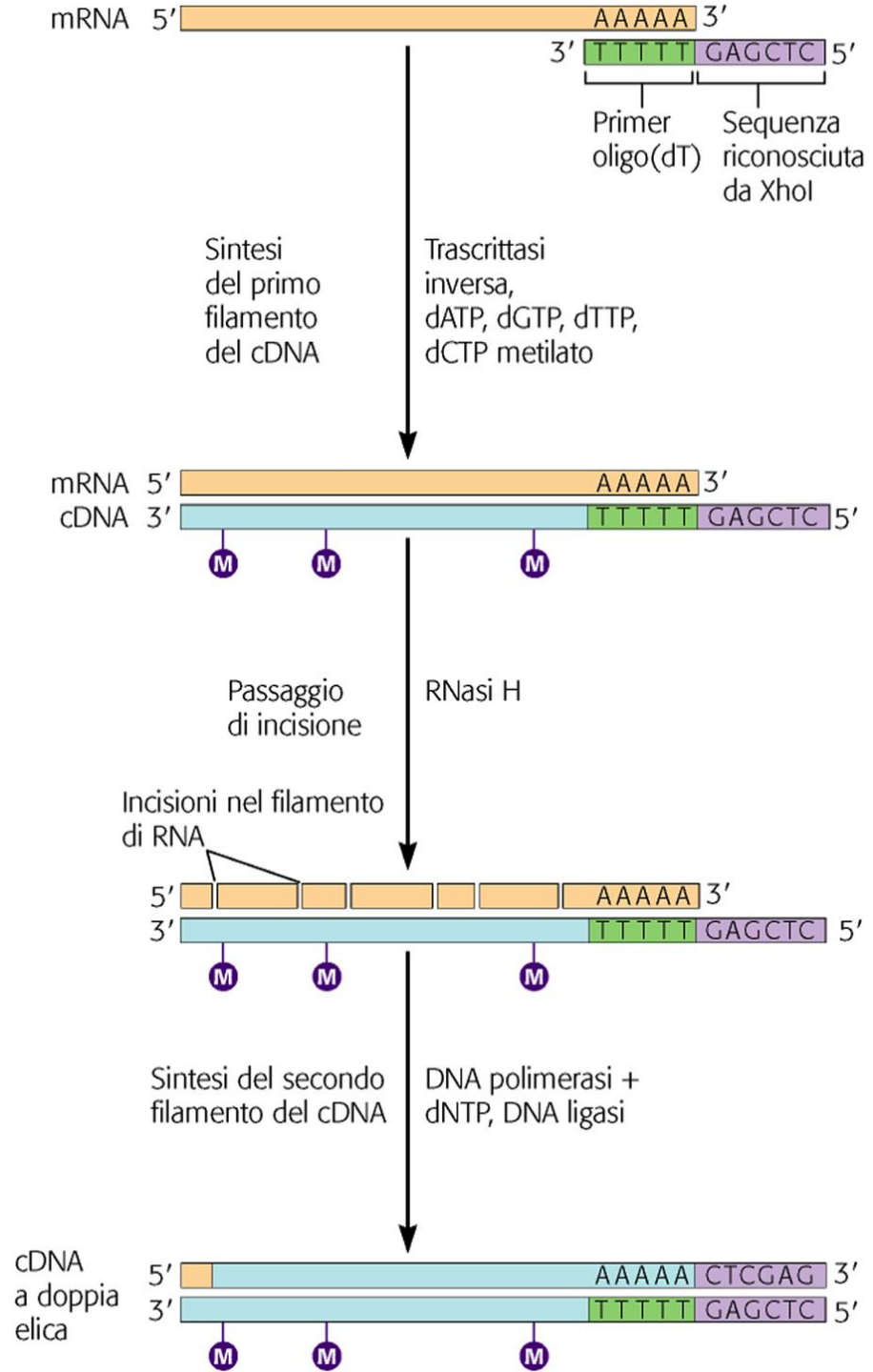
L'mRNA viene eluito



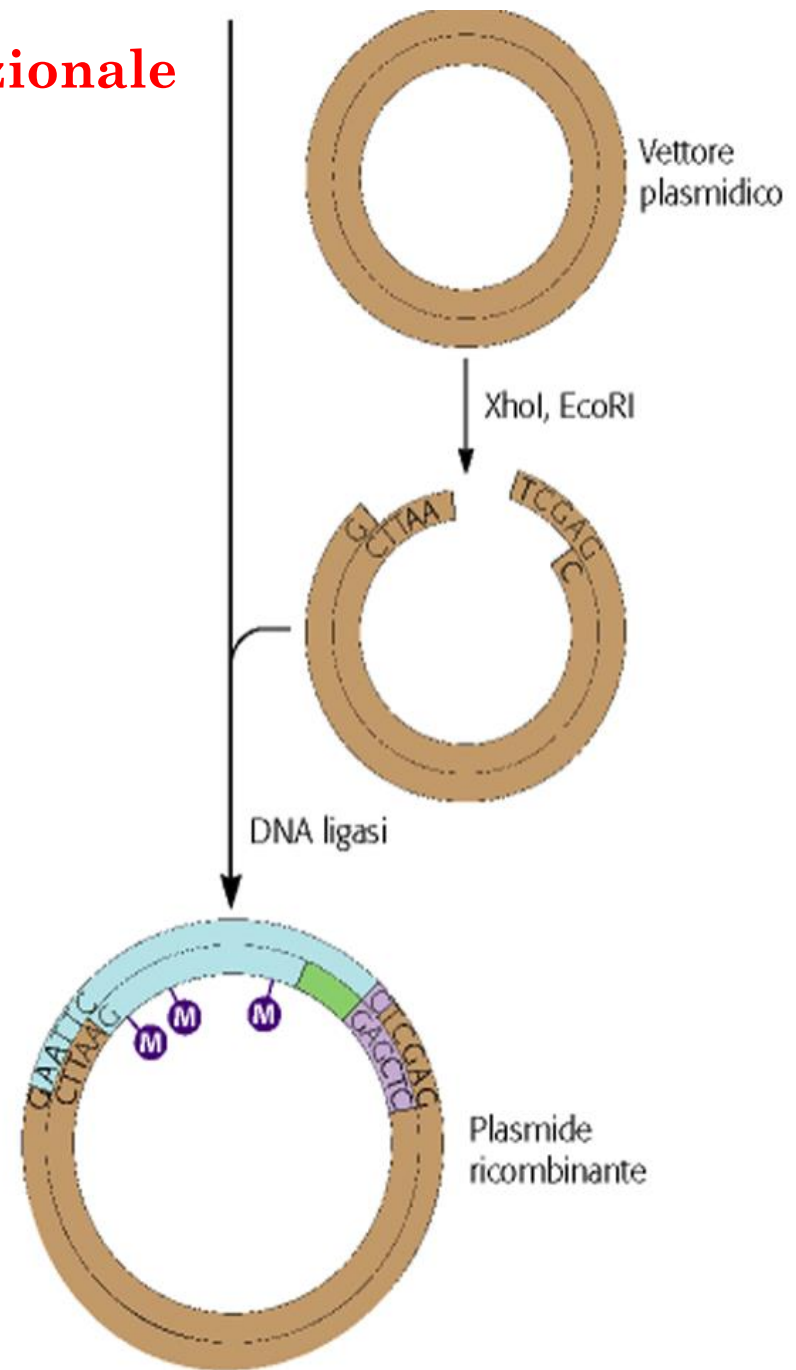
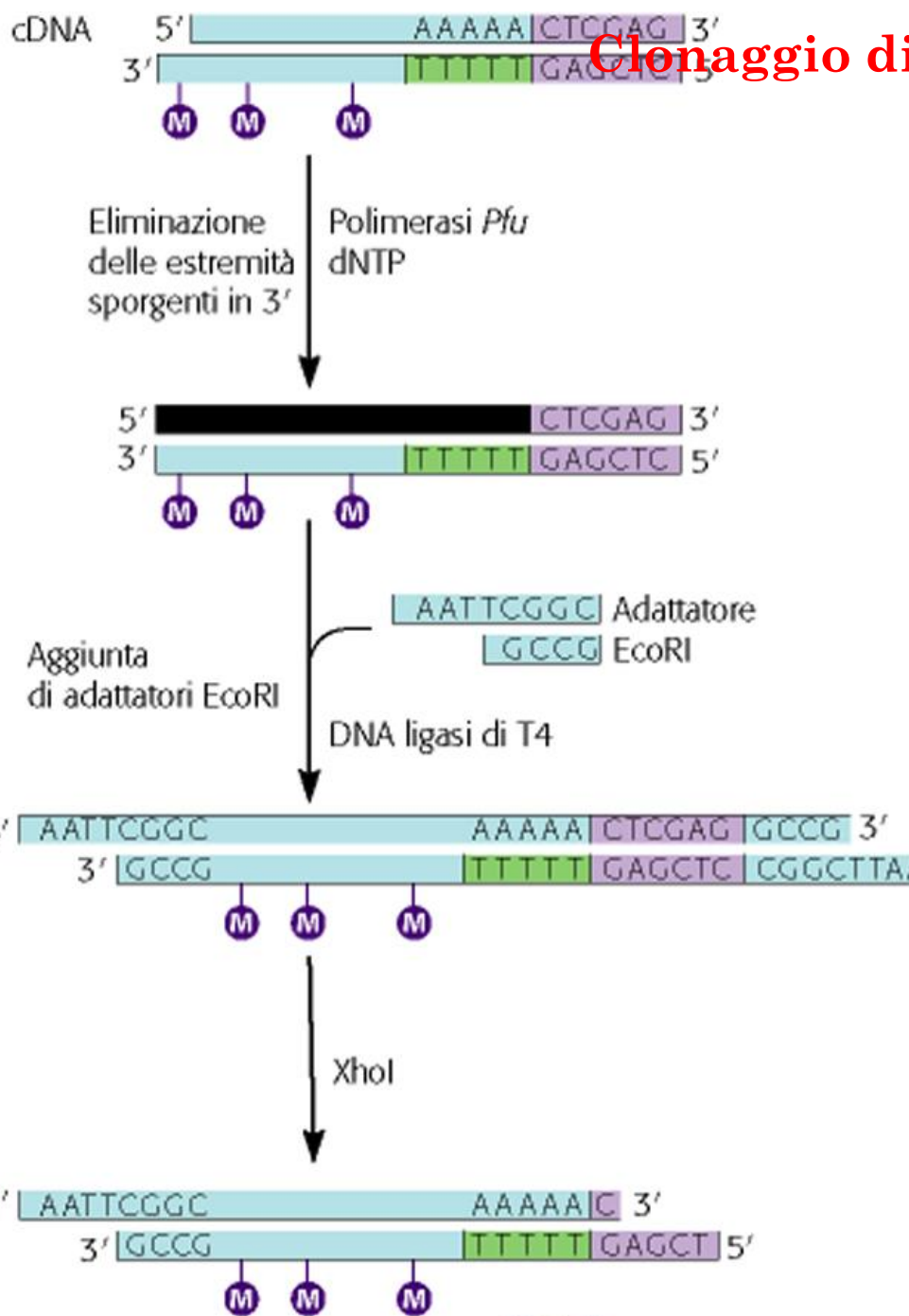
Sintesi di cDNA

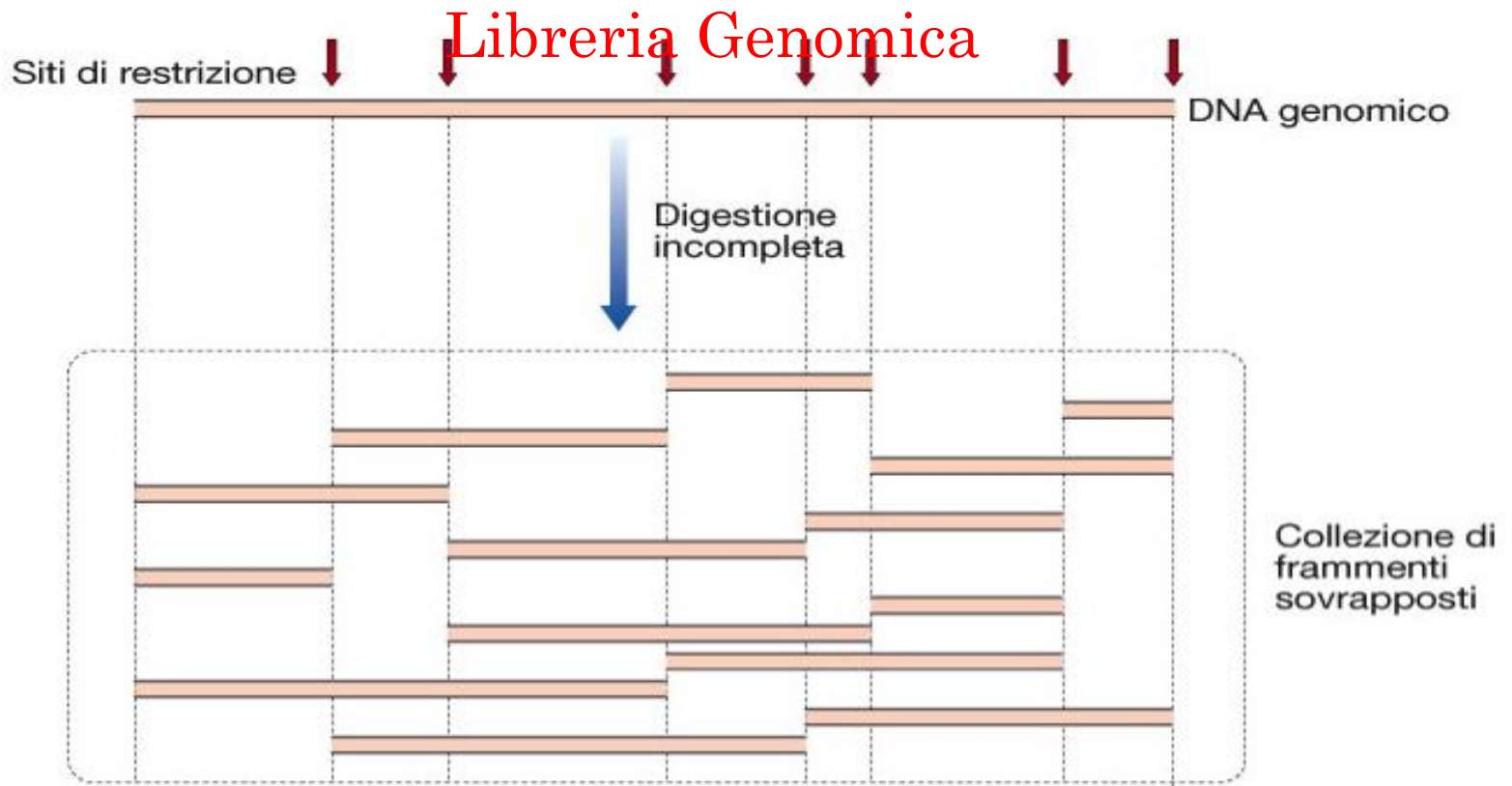
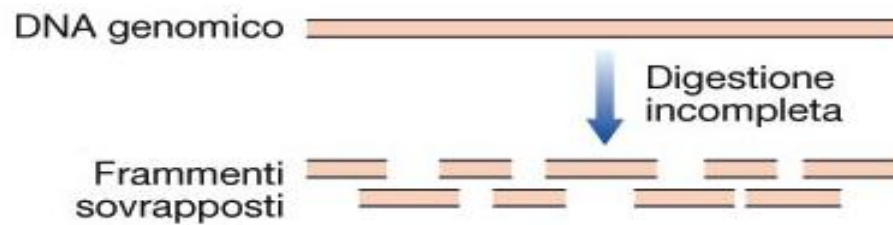
Se il cDNA deve essere impiegato per la costruzione di una libreria, i primer portano un sito di restrizione per il successivo clonaggio (XhoI). Oltre a dATP, dGTP, dTTP, si userà **dCTP metilato** così da produrre un cDNA metilato in cui eventuali siti XhoI non saranno riconosciuti dall'enzima.

L'RNasi H introduce dei nick nel filamento di mRNA che faranno da innesco per la sintesi di DNA. La ligasi infine chiuderà tutti i nick presenti nelle molecole di DNA ds



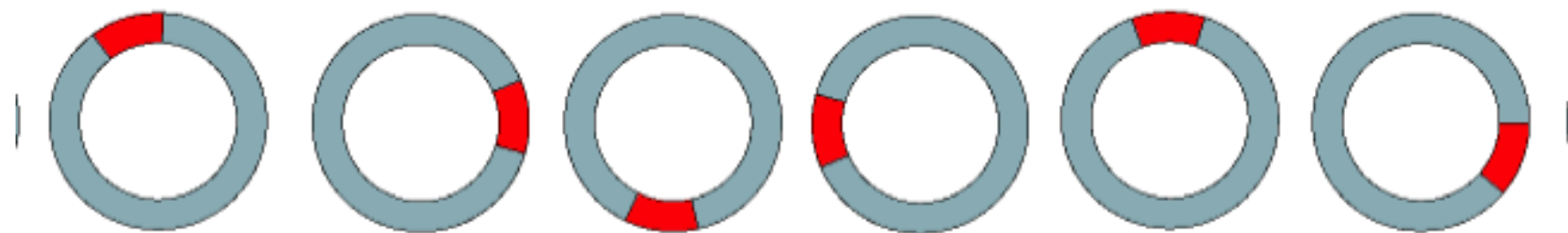
Clonaggio direzionale



A**B**

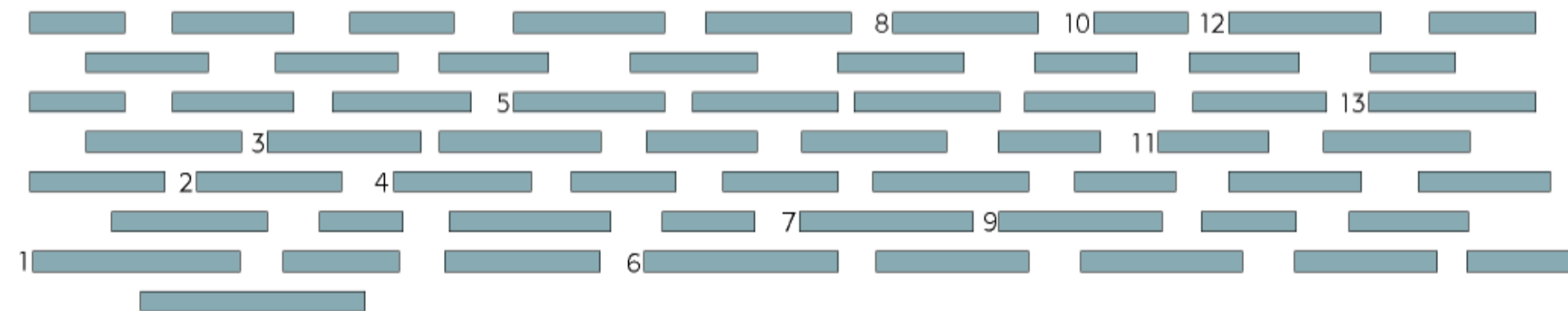


Costruzione di una libreria di cloni
con inserti lunghi che rappresenta
il genoma 10x



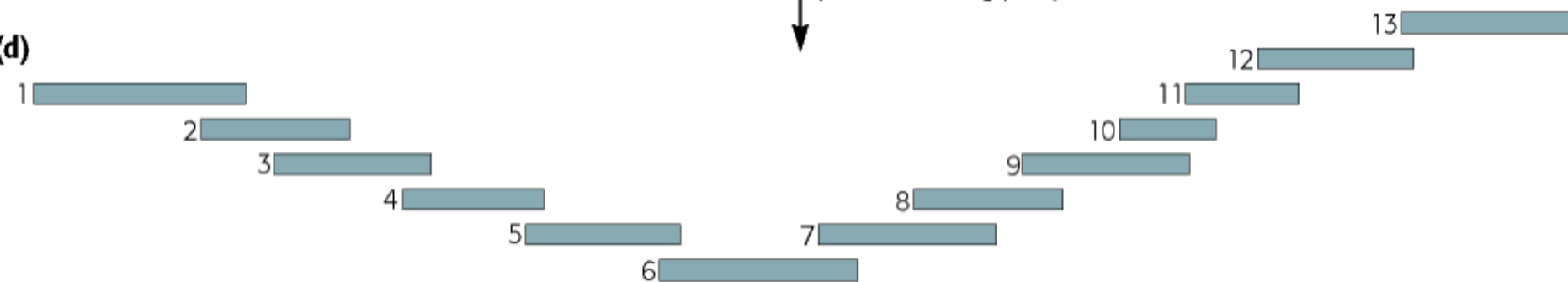
Costruzione della mappa di contig

(c)



Selezione del numero minimo di cloni
che copra l'intero genoma
(minimum tiling path)

(d)



Minimum Tiling Path

Quanti cloni indipendenti sono necessari per costruire una libreria genomica a saturazione?

Parametri da considerare:

- grandezza del genoma**
- complessità del genoma**
- taglia dei frammenti**
- tipo di vettore**

Una libreria si considera “ a saturazione ” quando teoricamente contiene almeno un clone di ogni frammento parzialmente sovrapposto con il precedente ed il successivo

Rappresentatività di una libreria di DNA genomico

Organismo	Dimensione del genoma aploide	Tipo	Dimensione dell'insero (f)	Probabilità (p)	Numero di cloni indipendenti della libreria
Uomo	3×10^9 basi	plasmide	4kpb	0,99	$3,5 \times 10^6$
		lambda	20 kpb	0,99	$7,7 \times 10^5$
		cosmide	40 kpb	0,99	$3,5 \times 10^5$
		YAC	600 kpb	0,99	$2,3 \times 10^4$

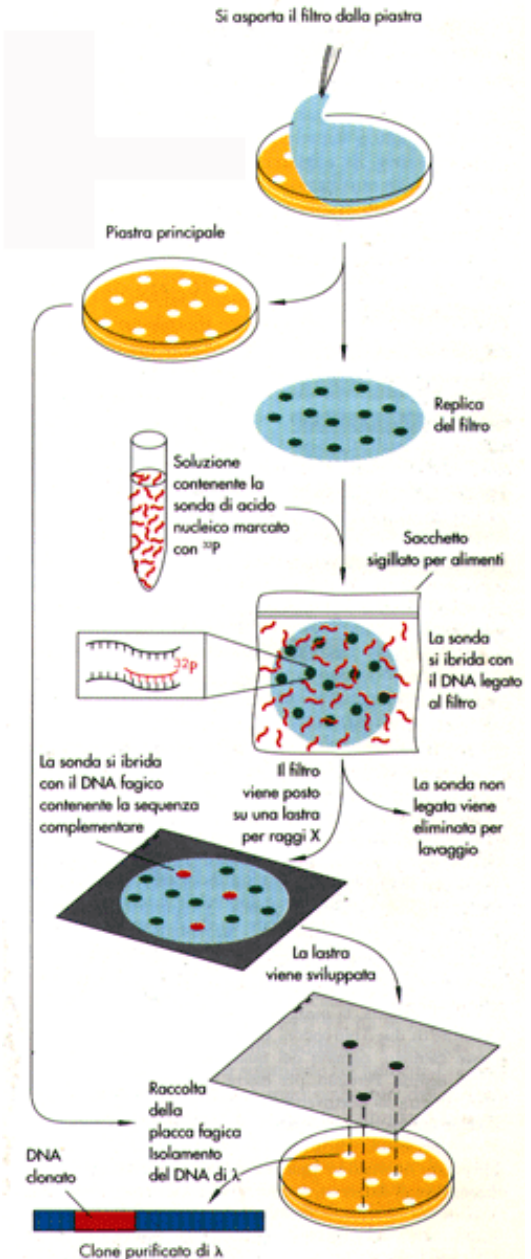
Clonaggio di YFG

Caso1: la sequenza del gene è nota

La strategia consiste nell' **analizzare la libreria con una sonda omologa al gene**. Dopo aver piastrato la libreria ad alta densità su ogni piastra si applica un filtro di nitrocellulosa. Dopo aver fatto adsorbire i fagi al filtro, questo viene rimosso e trattato in modo da fissare sul filtro il DNA fagico in forma denaturata. Si ibrida la membrana con la sonda radioattiva complementare al gene in analisi. Dopo un' incubazione, il filtro viene lavato con soluzioni a più alta stringenza ed esposto ad autoradiografia. Dopo aver identificato i cloni positivi, si procede ad uno **screening secondario**.

E' anche possibile utilizzare come sonda un oligo sintetico.

Se non conosciamo la sequenza del gene, ma è nota quella di un gene omologo, è possibile fare una sonda **eterologa**, sia come DNA che come oligo, ed effettuare ibridazioni a **bassa stringenza**.



Caso2: la sequenza della proteina è nota

Si puo' ottenere la sequenza aminoacidica di un frammento della proteina. Per ottenere una sonda per lo screening si deve derivare la sequenza nucleotidica corrispondente a quella aminoacidica.

Bisogna considerare la degenerazione del codice.

Per codificare il peptide PRATI per esempio possiamo usare:

P	R	A	T	I
CCA	AGA	GCA	ACC	AUU
CCC	AGG	GCC	ACU	AUA
CCG	CGA	GCG	ACA	AUC
CCU	CGC	GCU	ACG	
	CGG			
	CGU			

$4 \times 6 \times 4 \times 4 \times 3 = 1152$ possibili combinazioni.

Siccome per avere un' ibridazione stabile con un oligonucleotide conviene usare **un primer lungo almeno 15 bp**, ne consegue che per avere qualche probabilità di isolare il gene corrispondente bisogna derivare almeno 5 aminoacidi, meglio se più. Si sintetizza quindi **un pool di oligonucleotidi contenente, in quantità equimolare, ciascuno dei possibili candidati**

Si possono utilizzare due diverse strategie

1) Si sceglie una regione aminoacidica con la **minor degenerazione** del codice e si derivano **tutti** i possibili oligonucleotidi

Data per esempio la sequenza aminoacidica parziale

LAS**CMNEM**KRS

scegliamo: **CMNEM**: TGT/C, ATG, GAT/C, GAA/G, ATG,

Per aumentare la lunghezza dell'oligo senza aumentare la complessità del pool, aggiungiamo le prime due basi comuni a tutti i codoni che codificano la lisina AA

Possiamo sintetizzare un pool di soli otto nucleotidi.

TGT ATG GAT GAA ATG AA

TGC ATG GAT GAA ATG AA

TGT ATG GAC GAA ATG AA

TGC ATG GAC GAA ATG AA

TGT ATG GAT GAG ATG AA

TGC ATG GAT GAG ATG AA

TGT ATG GAC GAG ATG AA

TGC ATG GAC GAG ATG AA

2) Si costruisce un “indovinamero” o “guessmer”

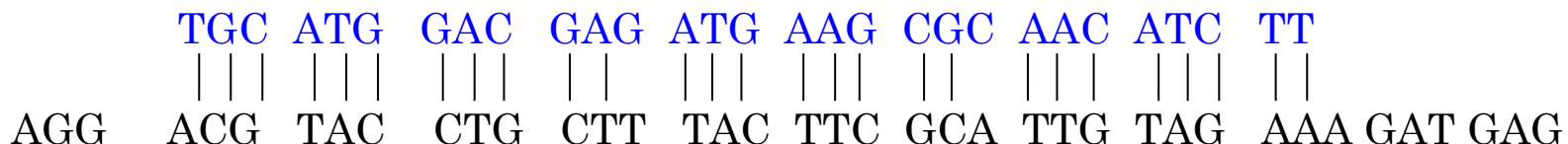
A partire dallo stesso peptide CMNEM si può sintetizzare un **unico oligonucleotide, più lungo, ma costituito da un’ unica sequenza.**

La sequenza viene definita sulla base della **frequenza di utilizzo del codone**, sulla sua **ridondanza** e sul **caso**. Se le zone di complementarietà sono abbastanza lunghe l’indovinamero riuscirà ad appaiarsi con il gene target anche in presenza di qualche mismatch.

Per ottimizzare l’ibridazione di questi guessmers si utilizzano condizioni di bassa stringenza, e si utilizzano sonde lunghe **40-60 bp**. Nei casi in cui non si possono escludere codoni molto variabili si può inserire **l’ inosina**, una particolare base che può appaiarsi a tutte e quattro le basi canoniche.

Esempio di “guessmer”

5’ -TGC ATG GAC GAG ATG AAG CGC AAC ATC TT-3’



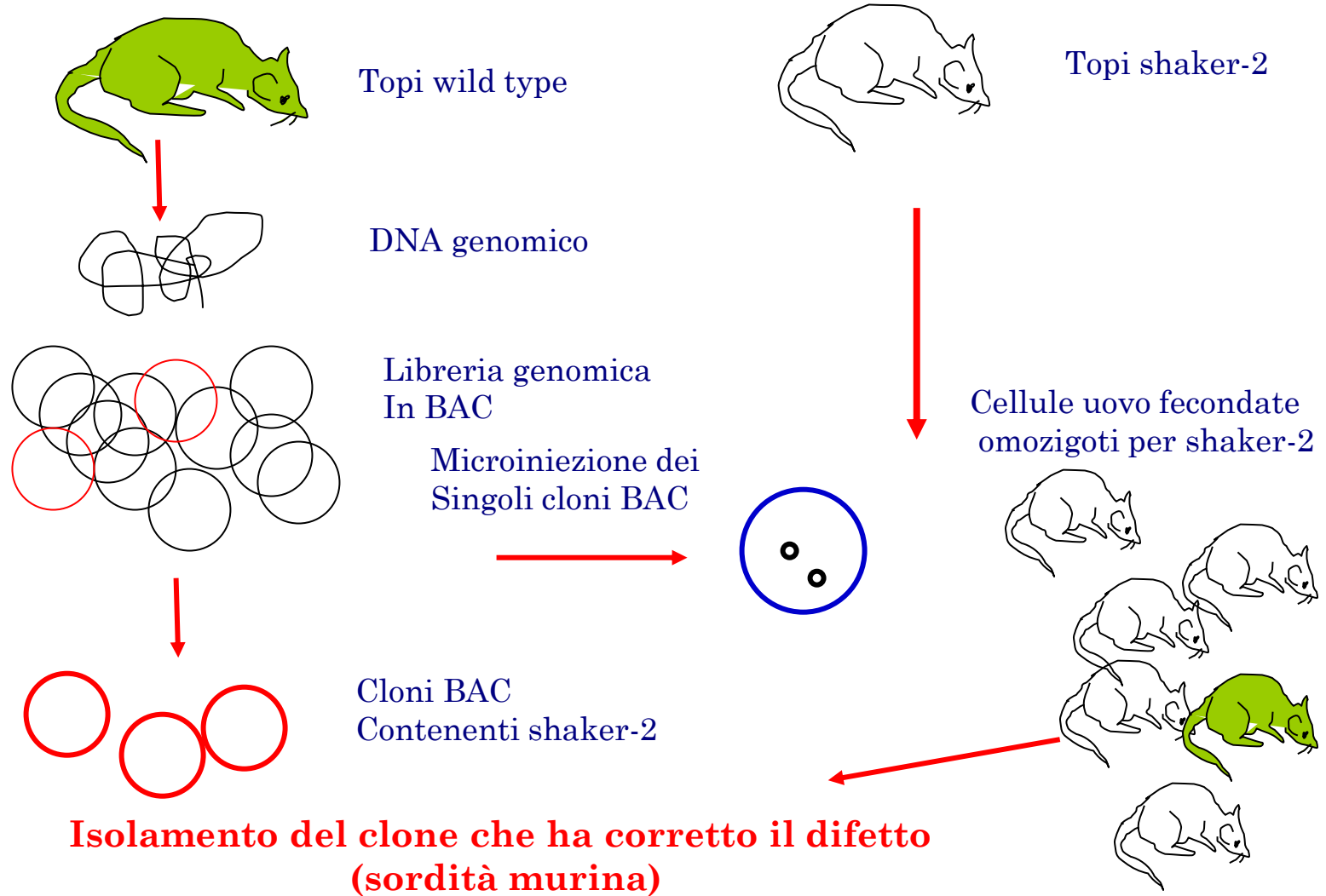
Screening di una libreria per complementazione funzionale

Questa strategia, detta per **complementazione funzionale**, si utilizza quando **l' unica informazione disponibile è di tipo funzionale**.

La complementazione funzionale è il processo mediante il quale una particolare sequenza di DNA è **in grado di compensare la mancanza di una funzione in una cellula/organismo mutante**, ripristinando così il fenotipo wild type.

Il primo esempio di clonaggio per complementazione funzionale è stato quello di uno dei geni **his** di lievito, che è stato identificato trasformando una libreria d' espressione di lievito in mutanti **hisB** di E.coli e selezionandoli su un terreno minimo -his.

L'isolamento di un gene a partire da una libreria "screenata" per **complementazione funzionale** è stata effettuata con successo anche in sistemi eucariotici complessi e in organismi interi come nel caso del gene shaker-2 un gene associato alla sordità murina.



Librerie di sottrazione

Lo screening di una libreria per ibridazione differenziale funziona molto bene quando i geni di interesse sono espressi ad alti livelli e quando esiste una differenza netta tra le due popolazioni in analisi, idealmente del tipo “tutto” o “niente”. Funziona male, invece **quando i livelli di espressione sono bassi** o le differenze tra popolazioni relative. In questi casi si usa **arricchire** una delle due popolazioni per i geni di cui interessa l'espressione mediante la costruzione di **librerie di sottrazione**.

- Estrazione mRNA linfociti T e mRNA linfociti B
- Sintesi cDNA ss da mRNA espressi nei linfociti T (mRNA rimosso con Rnasi)
- Ibridazione con un eccesso di mRNA dei linfociti B
- Appaiamento mRNA espressi in entrambi i tipi cellulari
- mRNA specifici dei linfociti T rimangono ss.
- Purificazione del mix di ibridazione su colonna di **idrossiapatite**, **specifica per il ds**,
- **Isolamento cDNA ss linfocita-T specifici**
- **Sintesi cDNAds**
- Clonaggio e costruzione **libreria sottratta**, specificamente arricchita in geni espressi nei linfociti T.

