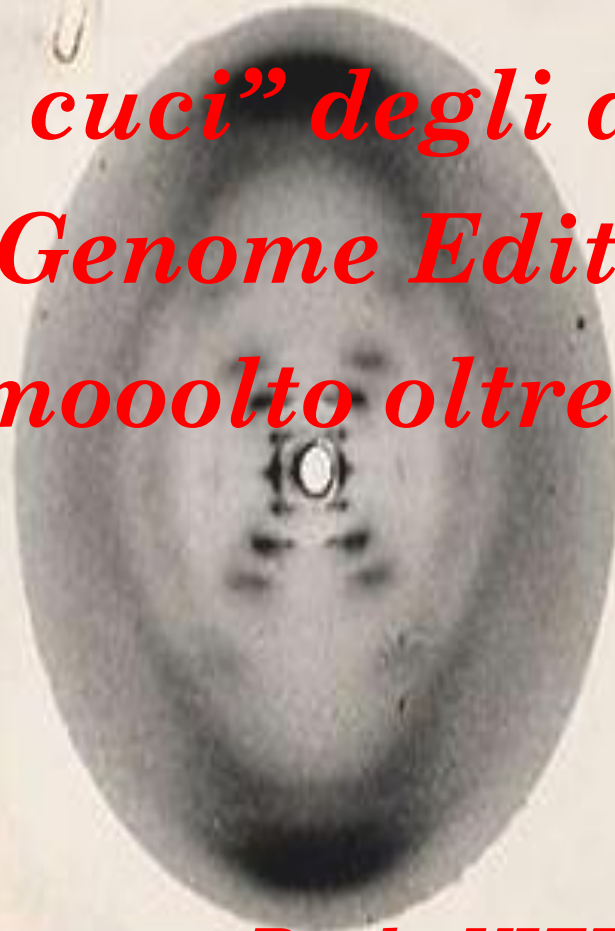


*Metodologie del DNA ricombinante
ovvero.....*

*dal “taglia e cuci” degli acidi nucleici
al Genome Editing
E mooolto oltre!!!!!!*



Franklin &
Gosling
DNA structure
Type B

Paola VITTORIOSO, PhD

Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin



Photograph 51



Lezione:

CU008

Lunedì 14-16

Aula Tecce-CU026

Venerdì 15-17

NO Lezione:

3 e 6 Aprile Pasqua

1 Maggio

ESAMI

8 Giugno

1 Luglio

23 Luglio

7 Settembre

9 Novembre

11 Gennaio 2027

Modalità d'esame:

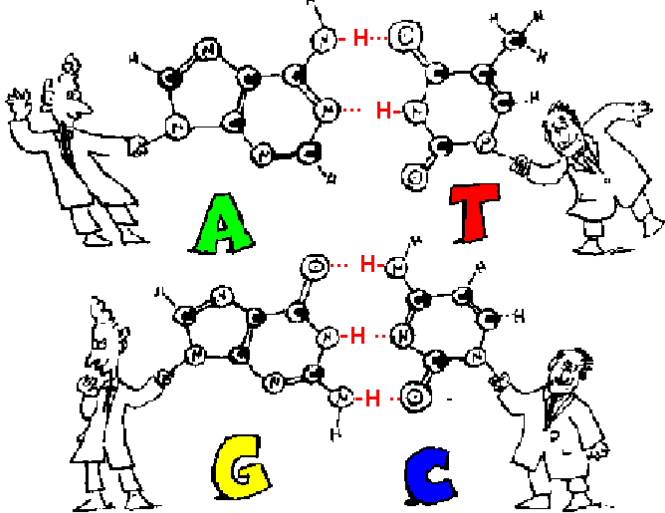
✓ **Discussione/Presentazione di un articolo.....**

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

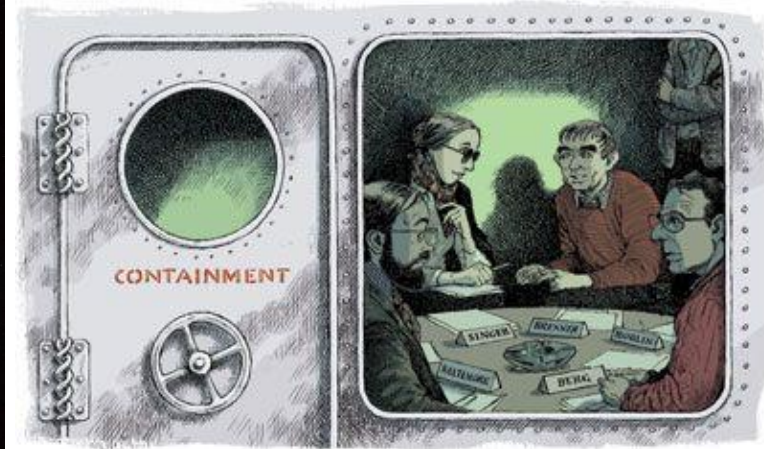
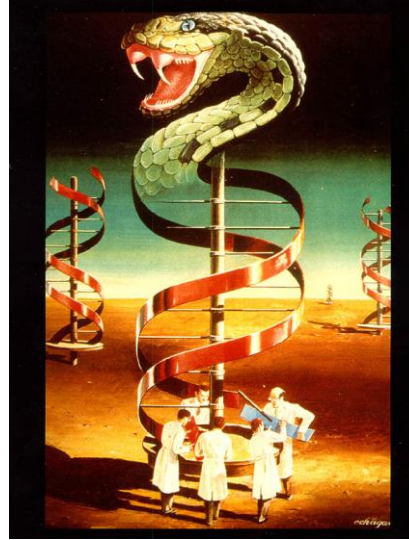
Commenti/Critiche

✓ **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)**
 - **Espressione eterologa**
 - **Interazione DNA-proteine**
 - **ChIP**
 - **RIP, CLIP, ChIRP, etc...**
 - **Genetica For/Rev, RNAi, Tilling, Talen, CRISP-Cas9**
 - **Chemical Genetics C. LONGO (Sapienza)**
 - **Trasformazione di cellule animali, di cellule vegetali**
 - **NGS S. GABRIELE (Agilent Tech.) (8/5 h15-17)**
- **ChIP on ChIP, ChIP Seq, RNA-seq, ATAC-Seq, CUT & RUN (Sapienza)**
 - **OGM**
 - **How to read-write a scientific article**
 - **Biosensori Analisi e discussione tecnica di articoli**



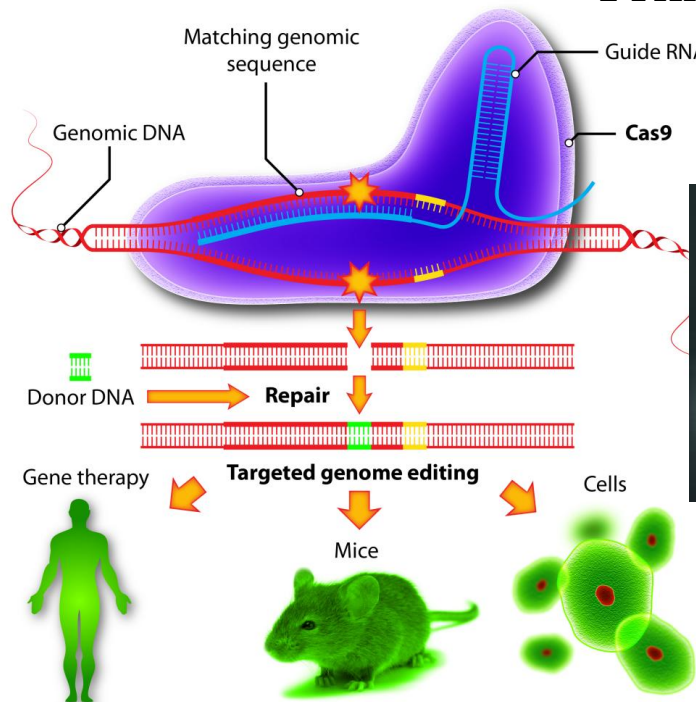
DNA structure 1953



**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.



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”

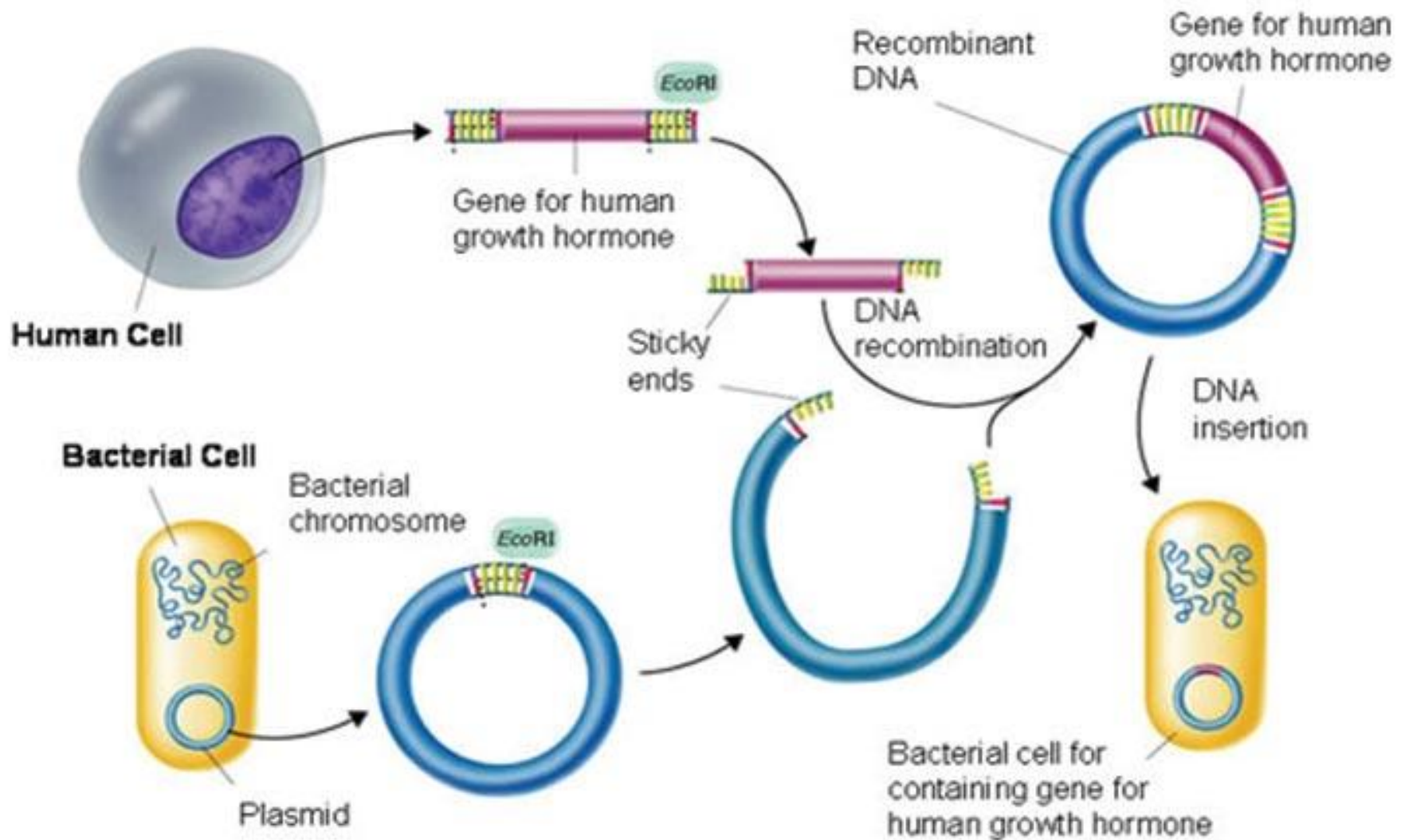
Il clonaggio molecolare

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.

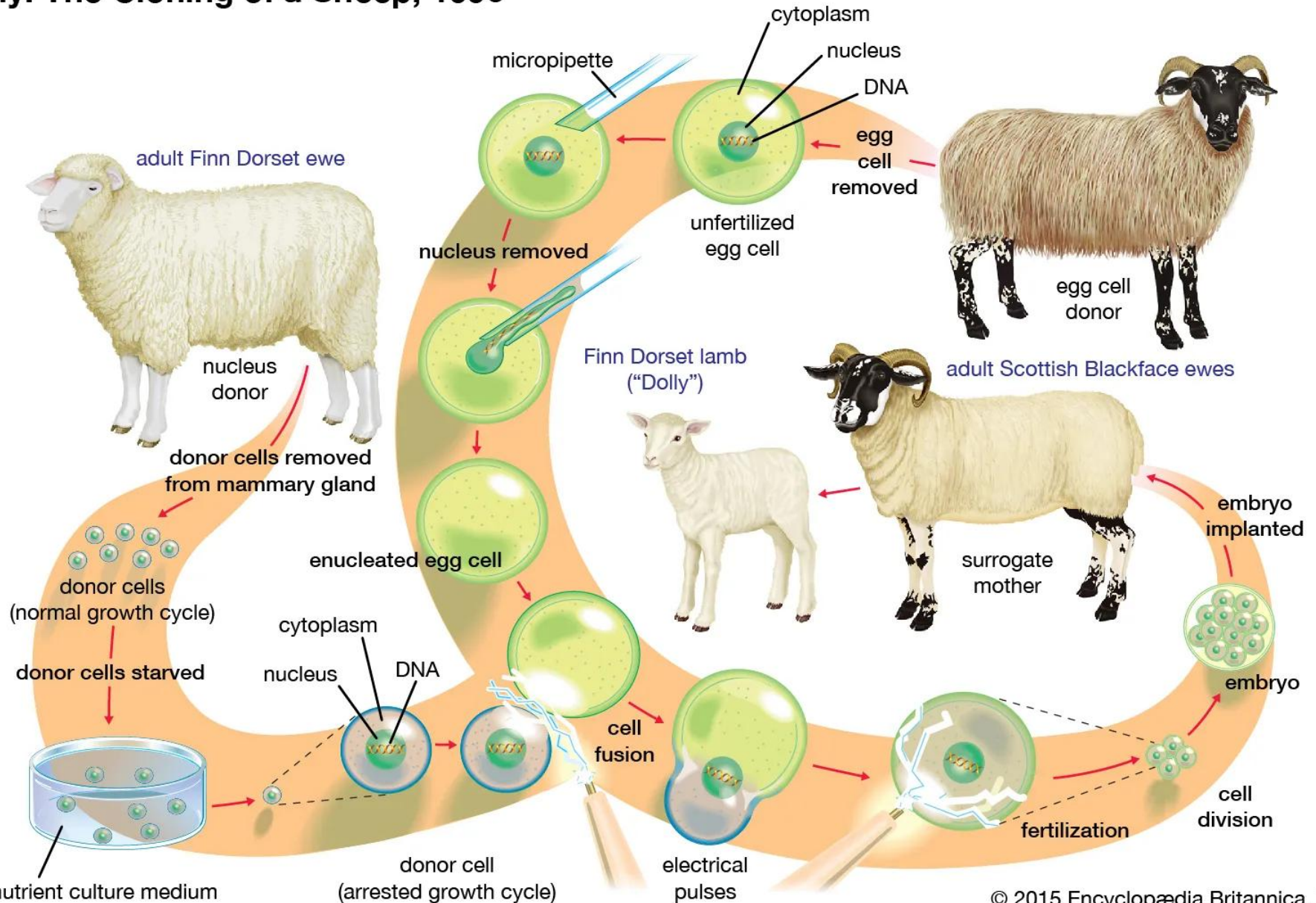
- il **clonaggio (o clonazione)** di organismi superiori (**Dolly**): creazione di individui geneticamente uguali senza alcuna modifica genetica
- il **clonaggio molecolare (mais transgenico)**: i geni vengono manipolati ed introdotti in organismi ospiti, arrivando infine alla creazione di organismi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

Molecular Cloning



Somatic Cloning

Dolly: The Cloning of a Sheep, 1996



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**

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
Ultrasonicazione	Microorganismi

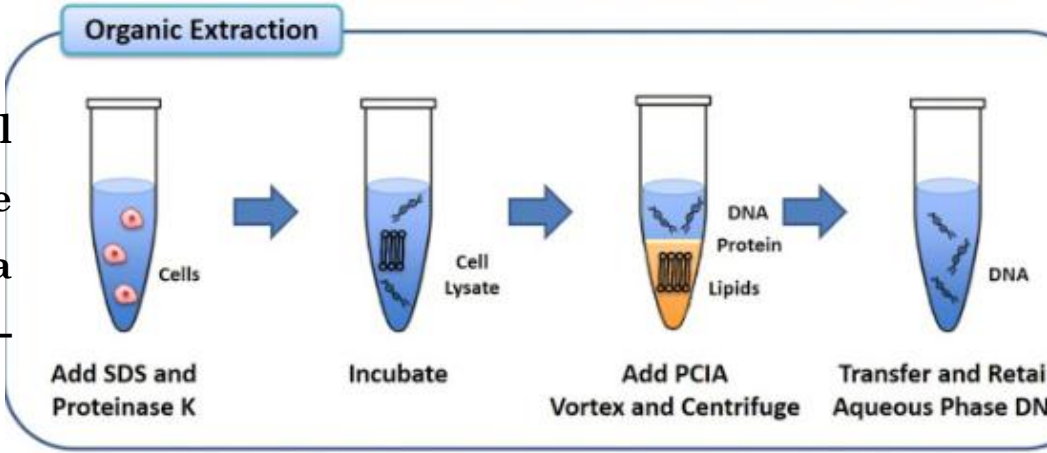
Tecniche di estrazione *rapida* di DNA

Analisi diagnostiche



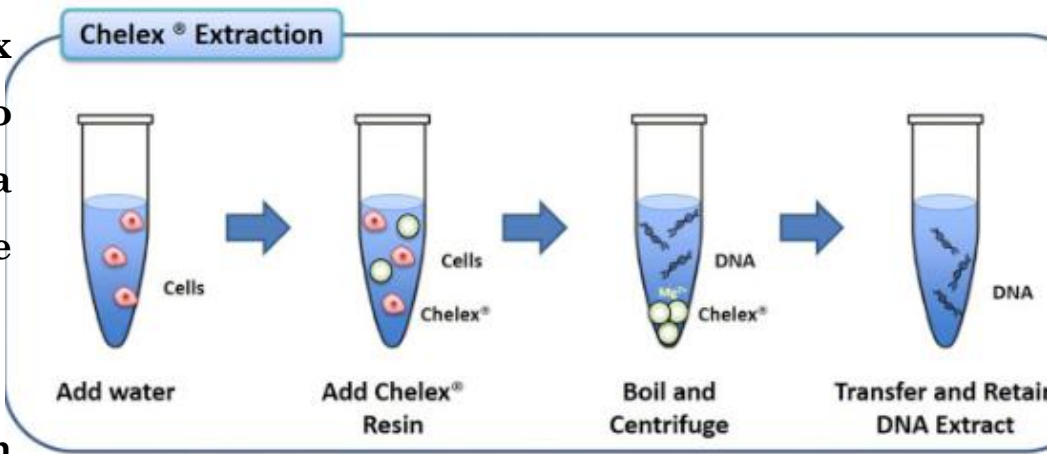
Organic Extraction

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



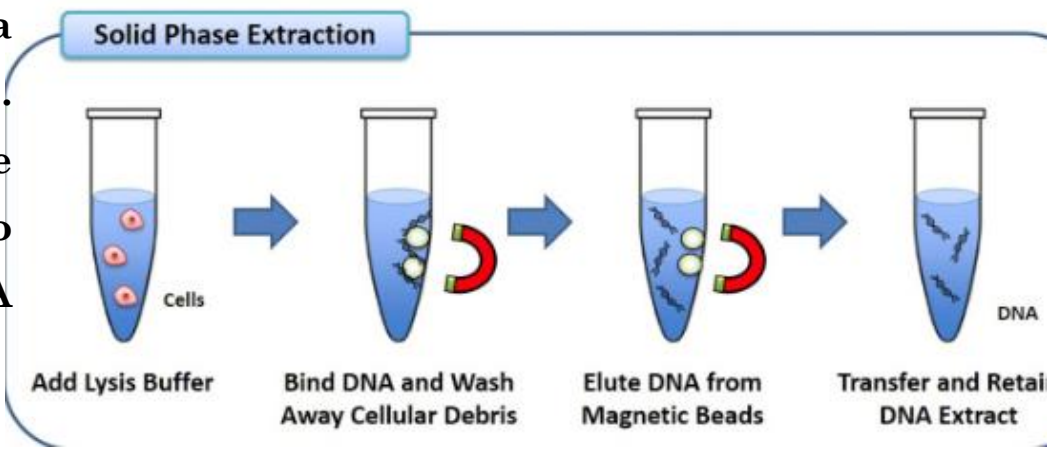
Chelex Extraction

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.



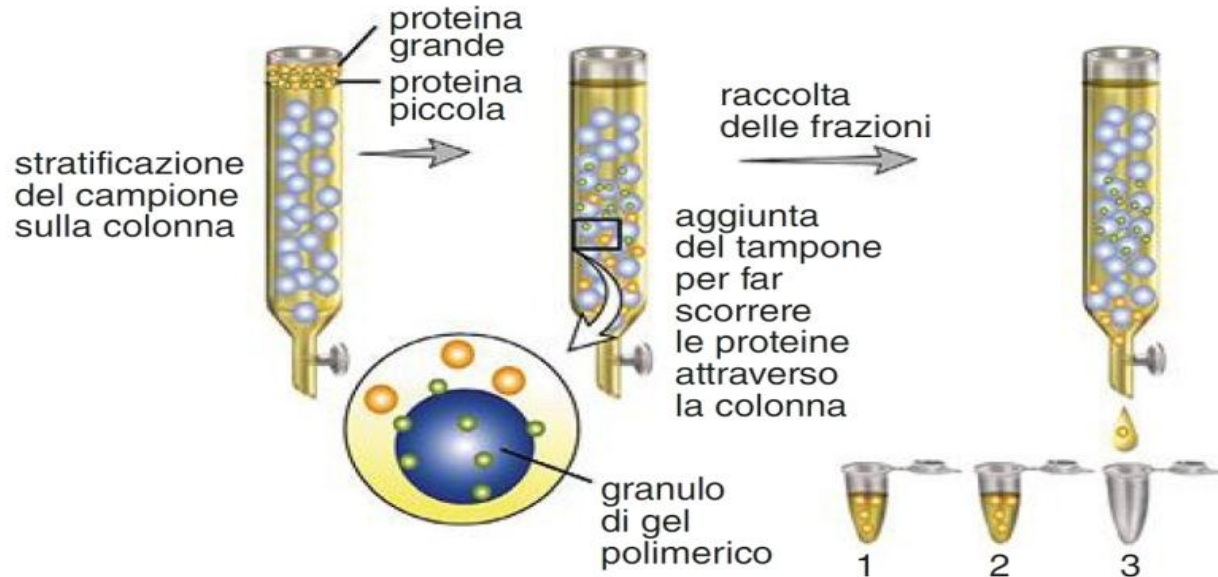
Tecniche di purificazione di DNA/RNA

Analisi in-depth



Per separare macromolecole di dimensioni diverse; quelle più grandi scorrono intorno ai granuli, quelle più piccole vi passano attraverso. Verranno eluite in frazioni diverse

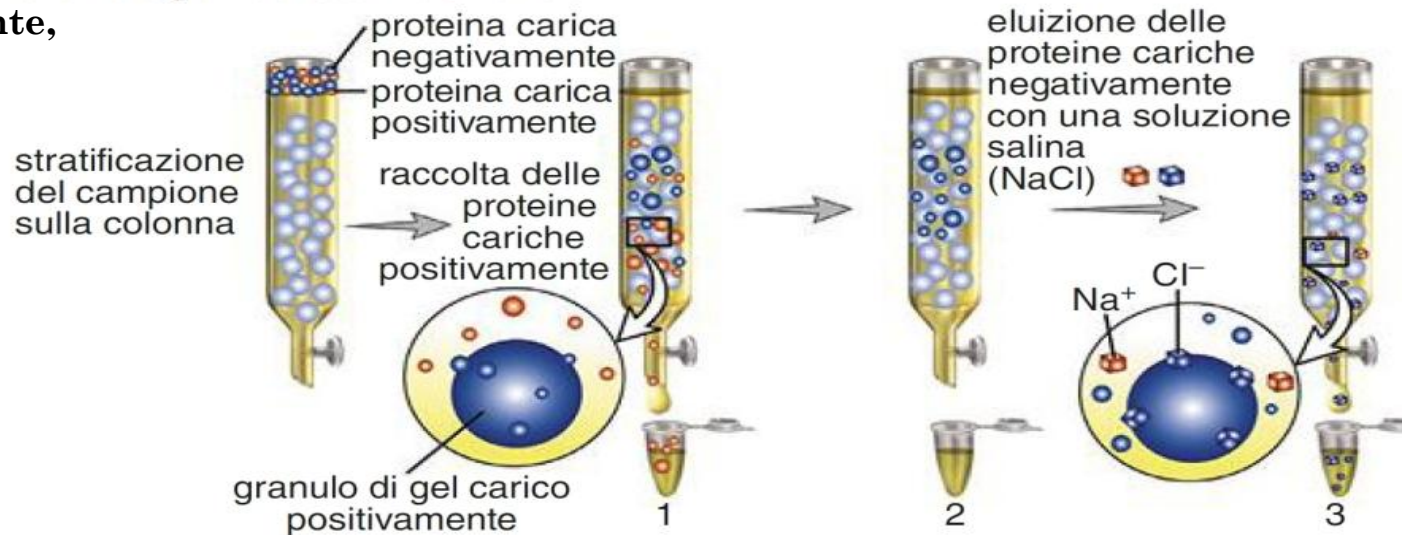
cromatografia per filtrazione su gel



(a)

DNA, carico negativamente, può essere separato per cromatografia a scambio ionico su colonne contenenti scambiatori anionici carichi positivamente, come il DEAE (Dietilaminoetil)

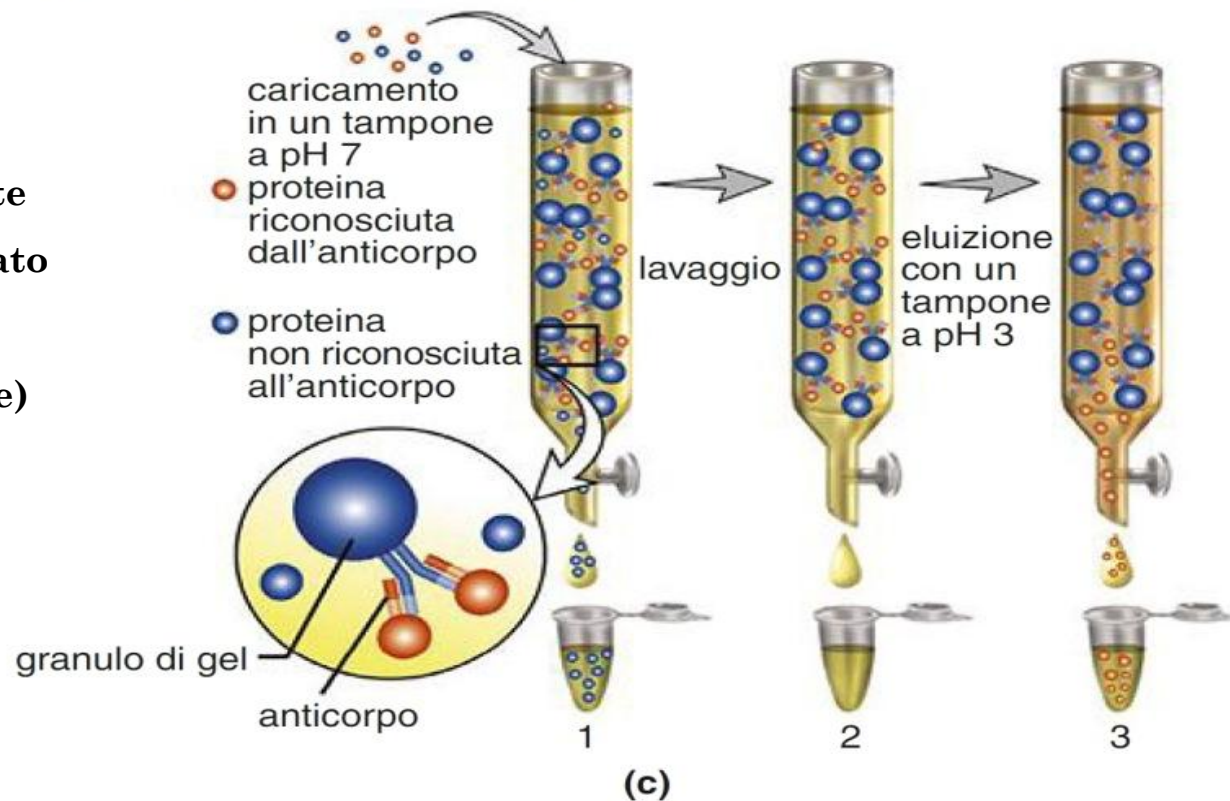
cromatografia a scambio ionico



(b)

cromatografia di affinità con anticorpi

Le colonne sono costituite da granuli a cui è attaccato un ligando (anticorpo, substrato, small molecule) che interagisce con la molecola di interesse



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

soluzione tampone

frammenti di DNA

gel di agarosio

elettrodo

—
(CATODO)

elettrodo

+
(ANODO)

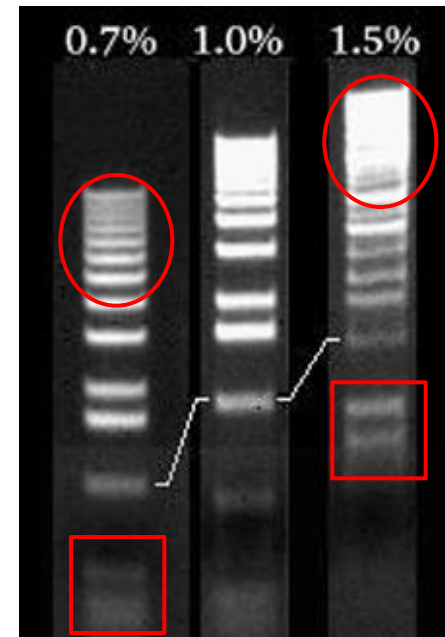
i frammenti di DNA piccoli
avanzano nel gel di più
di quelli grandi

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

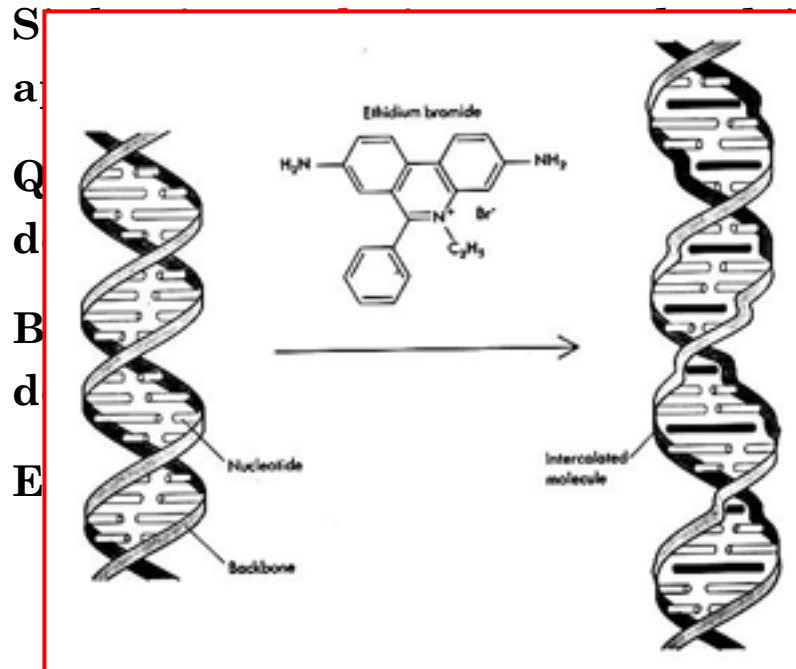


Il gel di Agarosio è una matrice tridimensionale formata da molecole di agarosio elicoidali strutturate in fasci superavvolti, raggruppati in strutture tridimensionali formanti canali e pori attraverso i quali possono passare delle biomolecole. La struttura 3-D è tenuta insieme da legami idrogeno e può 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.

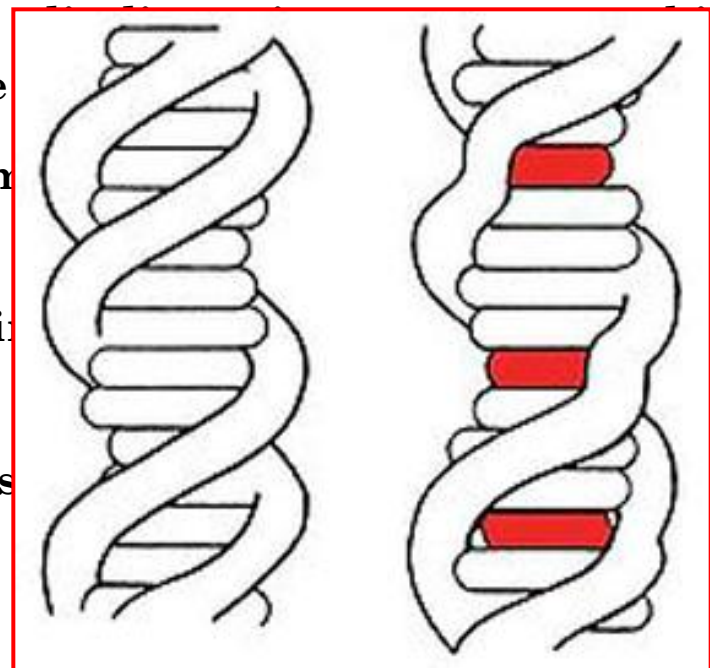
Il gel di poliacrilammide (PAGE) è utilizzato per separare solitamente proteine o acidi nucleici ad alta risoluzione, in base alla loro mobilità elettroforetica.

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

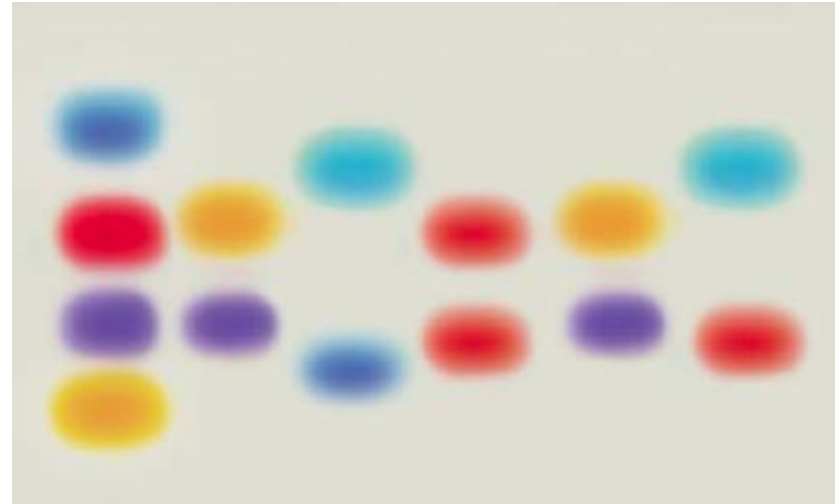
L'intercalazione induce distorsioni strutturali.

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

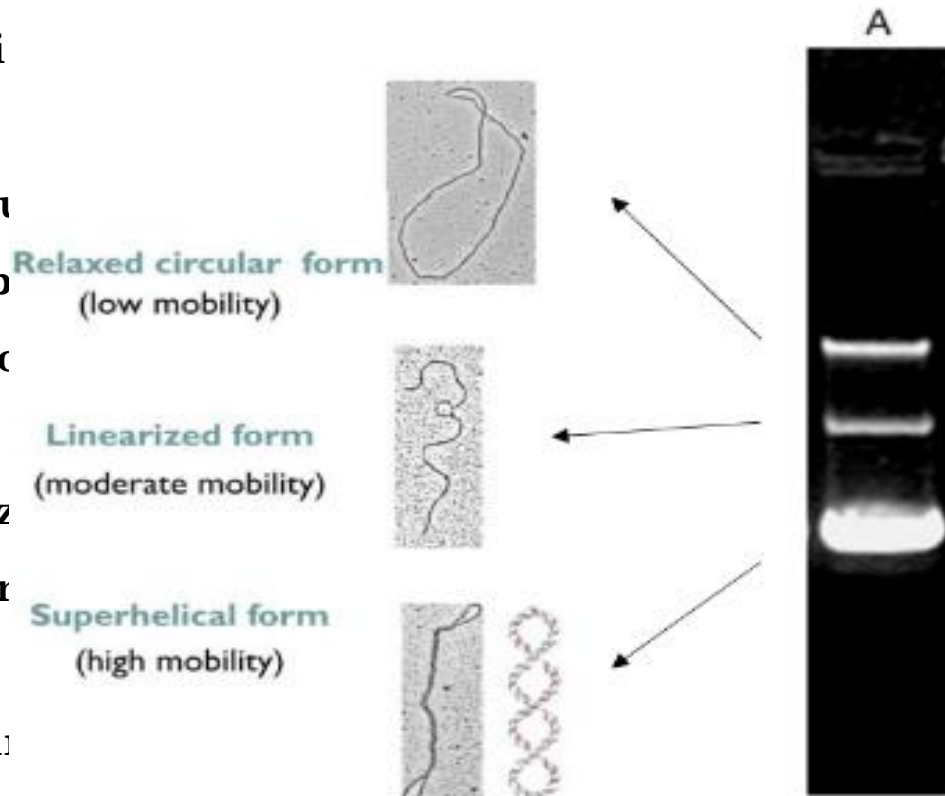
Il movimento del DNA è influenzato dalla conformazione della molecola di DNA, per esempio, DNA superavvolto di solito si muove più velocemente di DNA «rilassato», perché è strettamente avvolto e quindi più compatto. In una normale preparazione di DNA.

L'elettroforesi si come la banda p («lineare») e la f La velocità con differenti condiz maggiormente in gel.

L'etidio bromu superavvolgimen

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.



molteplici forme di

orma «superavvolta»

ma circolare aperta

come bande minori.

io cambiare usando

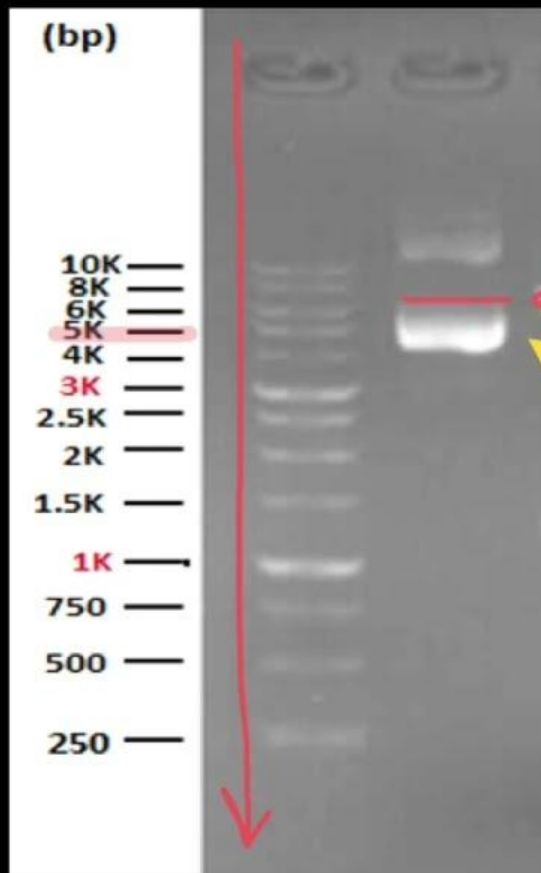
circolare può essere

tensione dei pori del

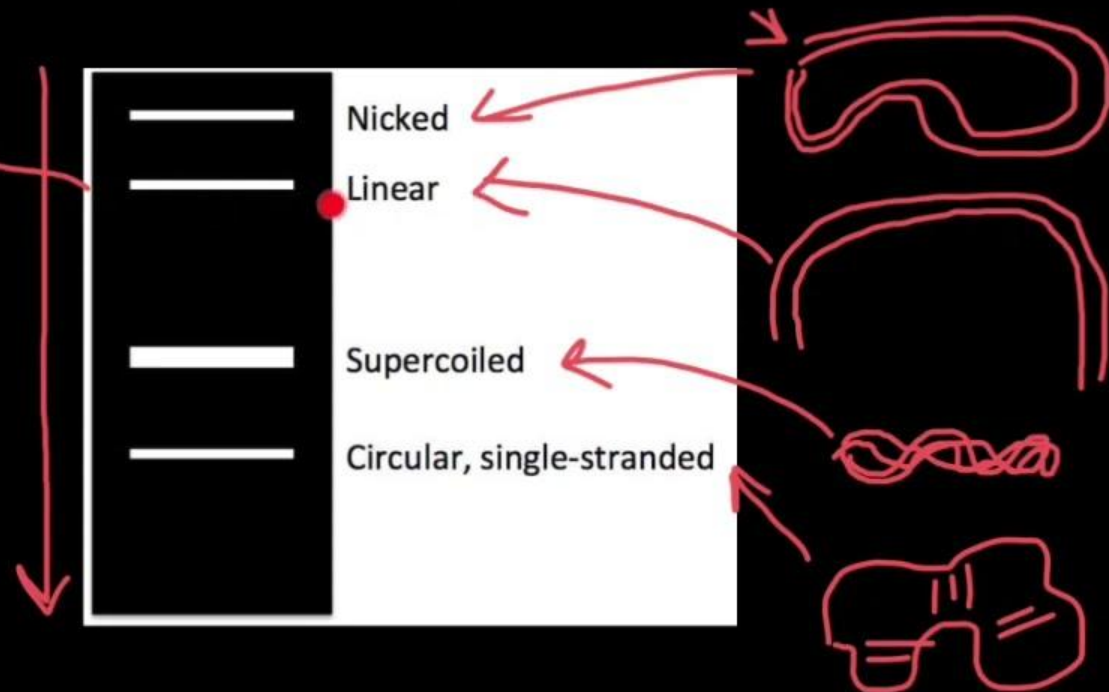
zza, così come il

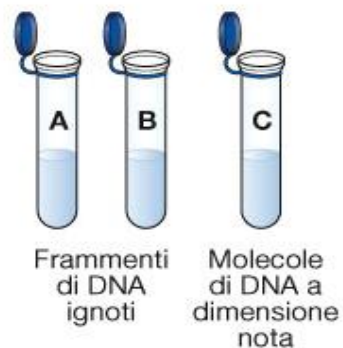
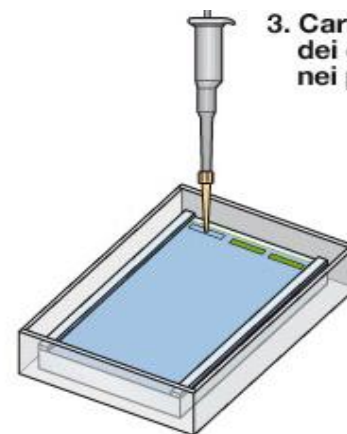
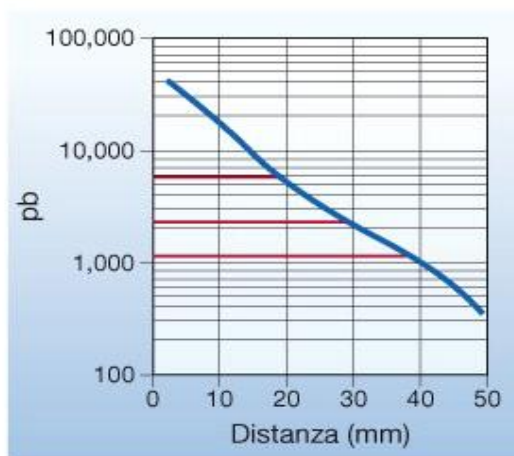
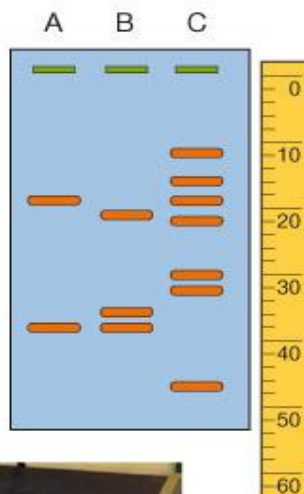
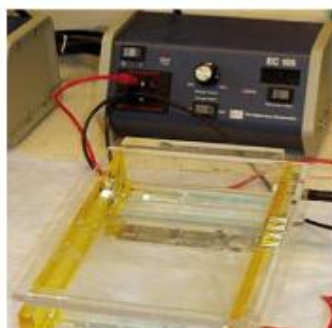
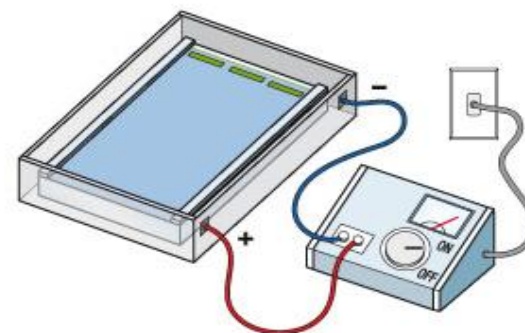
a presenza nel gel

Why is my plasmid smaller than what I expect after plasmid extraction?



Here is the gel electrophoresis of my plasmid after kit extraction. I expected a size around 6500 bp but I think I've got a smaller band. What's your opinion about this issue?



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 diagnostica 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**

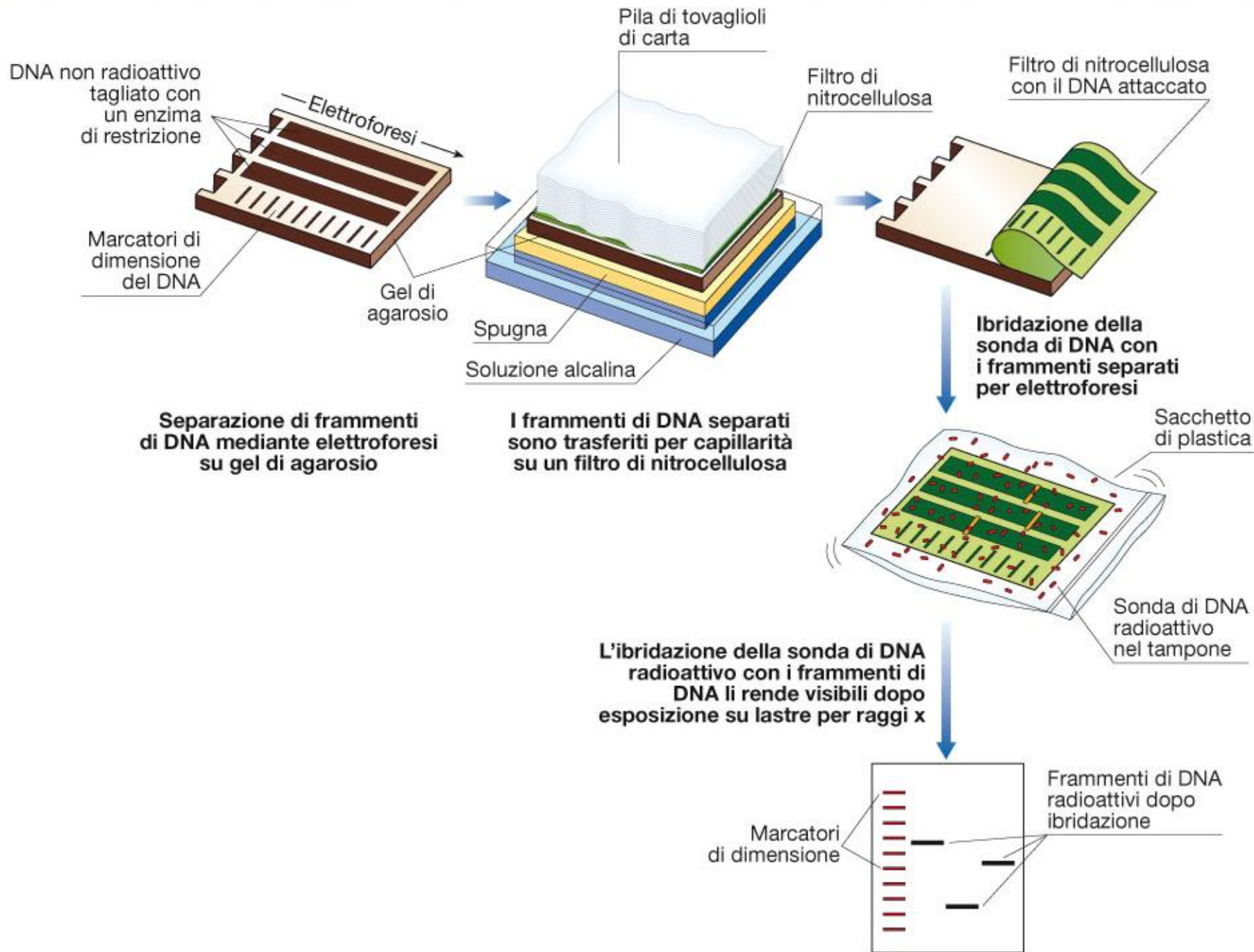
Messo a punto da Southern al fine di determinare la presenza, in una miscela eterogenea di frammenti di DNA separati in gel d'agarosio, di frammenti complementari a specifiche sequenze di DNA.

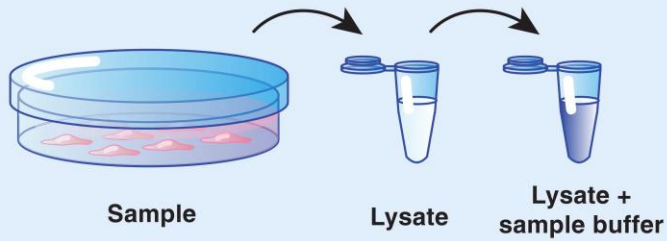
- **Northern blotting**

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**

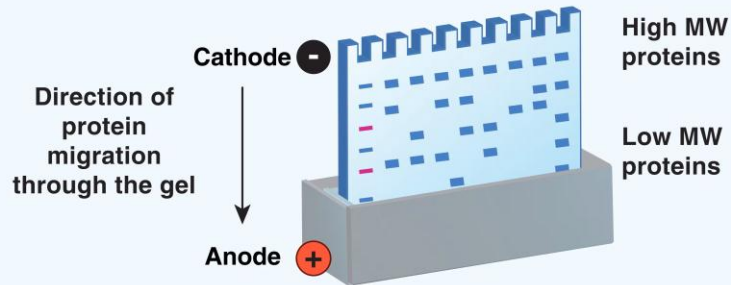
La metodica consiste nel trasferimento su membrana di nitrocellulosa/nylon di proteine separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide. Le proteine, una volta fissate stabilmente al supporto solido, possono essere analizzate sfruttando la loro capacità di interazione con una serie di ligandi,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





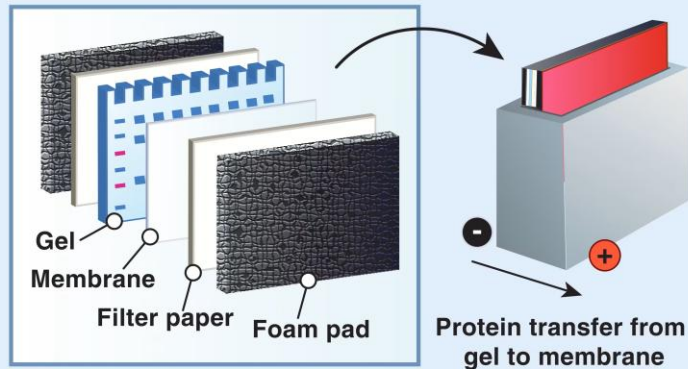
1 Sample preparation

Lyse the sample in an appropriate lysis buffer. Reduce and denature the sample with sample buffer containing SDS and β -mercaptoethanol. Heat the sample at 95°C 5 mins.



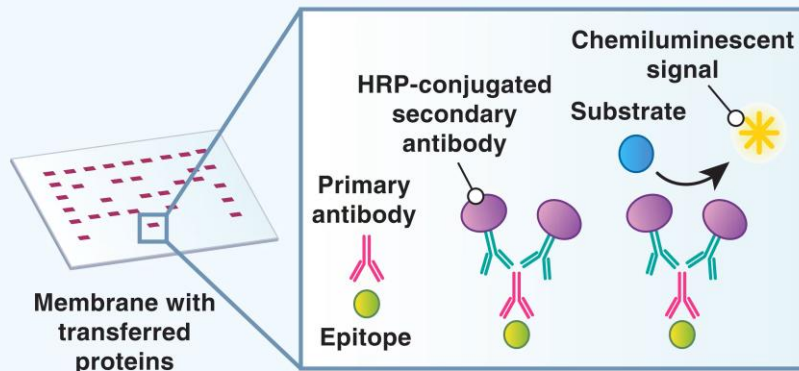
2 Gel electrophoresis

Load an optimized quantity of sample onto the gel. Perform gel electrophoresis at 100 - 200 V for 30 mins - 2 hrs. Proteins separate according to size, with smaller proteins migrating more quickly through the gel.



3 Membrane transfer

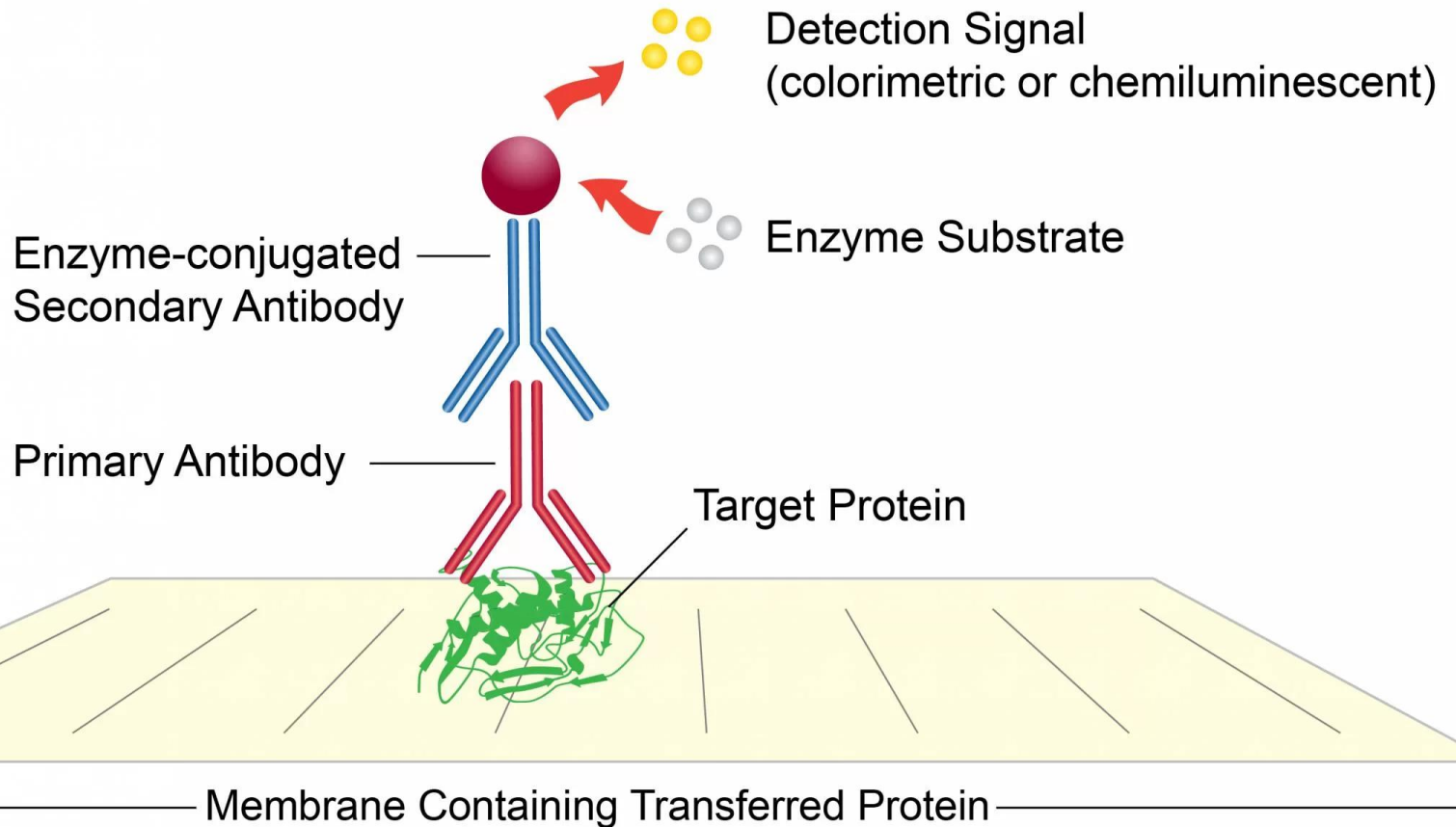
Prepare cold transfer buffer and the membrane. Assemble the transfer sandwich with the gel near the cathode (-) and the membrane near the anode (+). The negatively charged proteins will migrate out of the gel onto the membrane. Perform the transfer at 30 V O/N at 4°C or 100 V 1 hr.



4 Immunodetection

Use a total protein stain to check the transfer efficiency. Block the membrane in an appropriate blocking buffer (milk, BSA, etc.). Incubate the membrane with primary antibody 1 hr RT or 4°C O/N. Incubate with secondary antibody 1 hr RT. Perform the detection step (ex. using a chemiluminescent substrate kit). Perform data analysis.

Detection in Western Blots



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.**

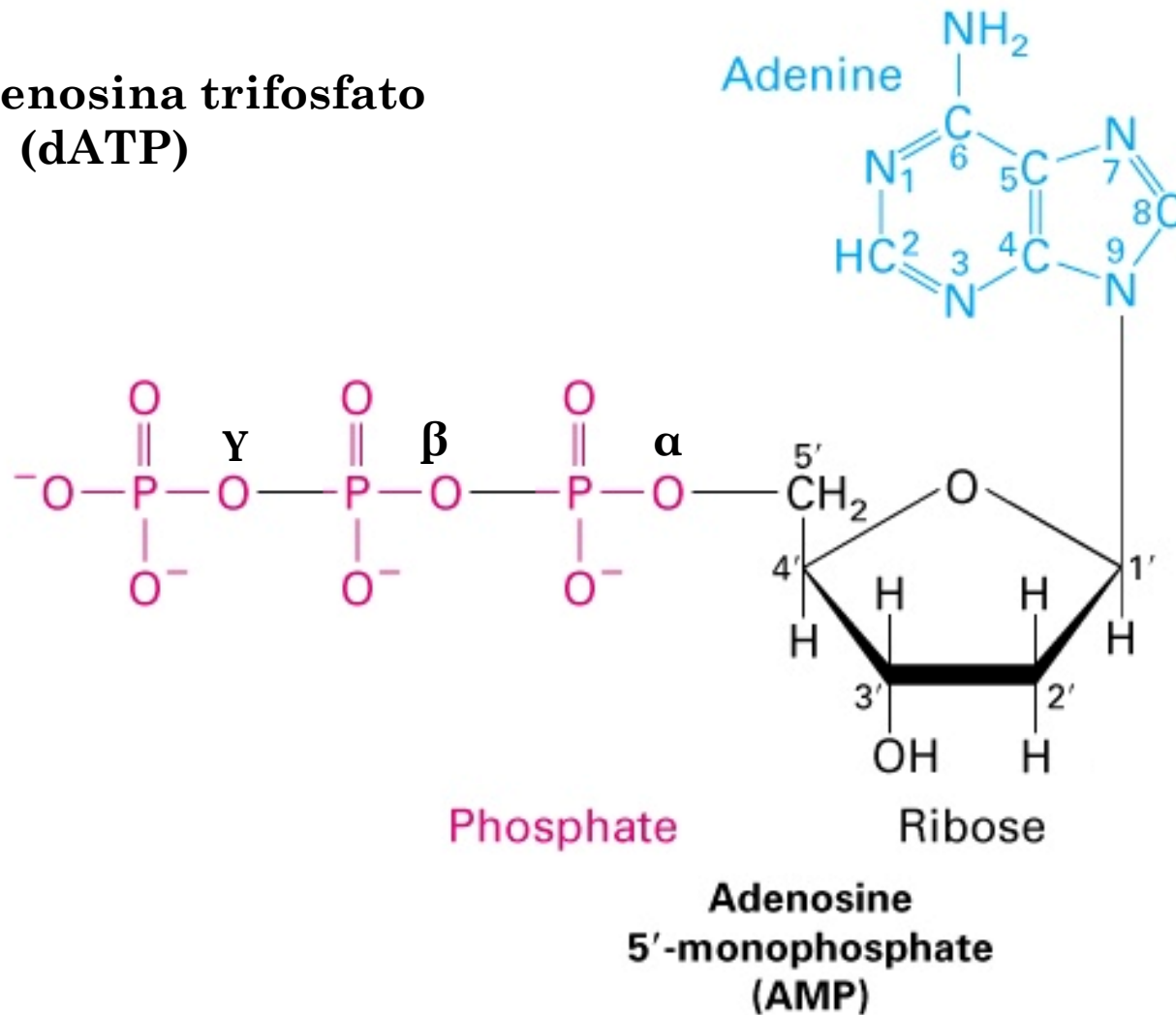
I radioisotopi generalmente usati sono **P^{32} dNTP**, o **S^{35} dNTP**

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:

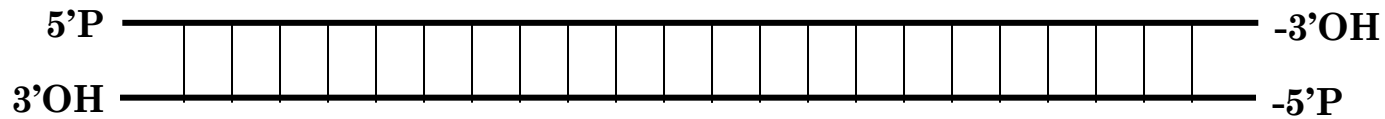
- Marcatura terminale al 5' utilizzando la **polinucleotide chinasi**
- Nick translation
- Random priming

Deossiadenosina trifosfato (dATP)

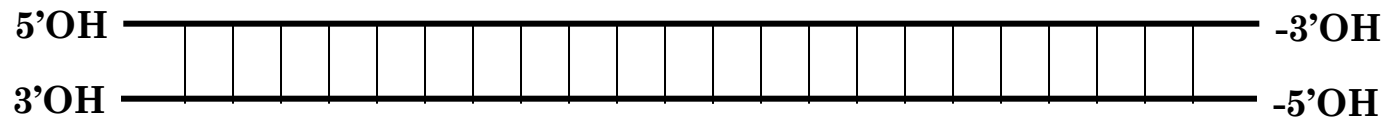


Le unità di fosfato si designano α , β e γ . Il fosfato α si fissa direttamente al 5' dello zucchero deossiribosio. **Durante la sintesi del DNA il fosfato α prende parte alla formazione del legame fosfodiesterico, mentre i gruppi β e γ vengono rilasciati come unità di pirofosfato**

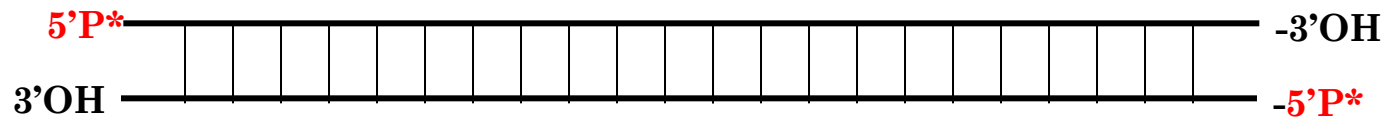
Marcatura terminale al 5'



Trattamento con fosfatasi

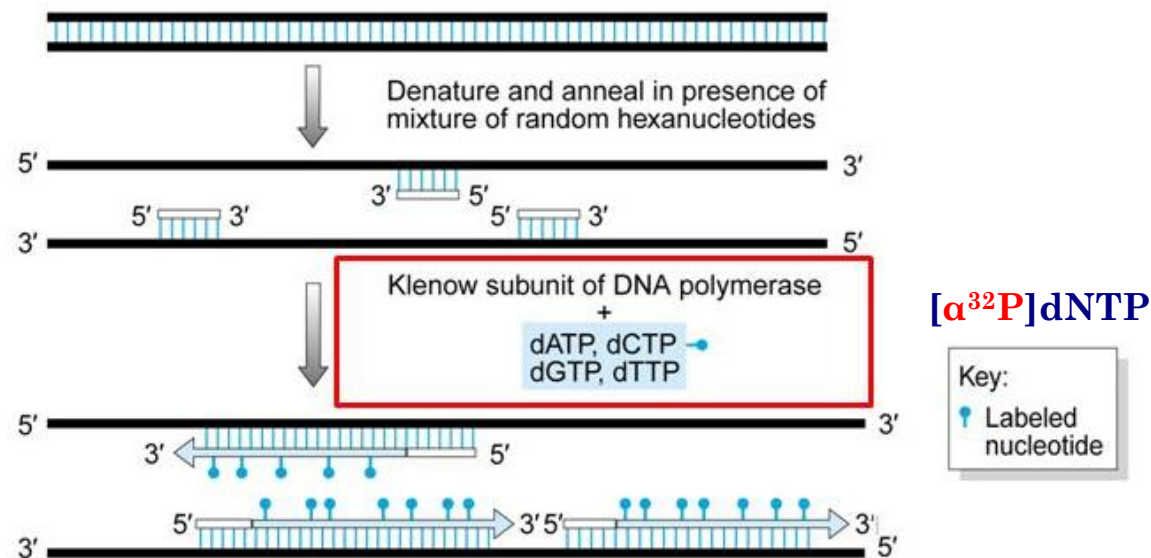


Polinucleotide
chinasi
+ [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP



Random priming

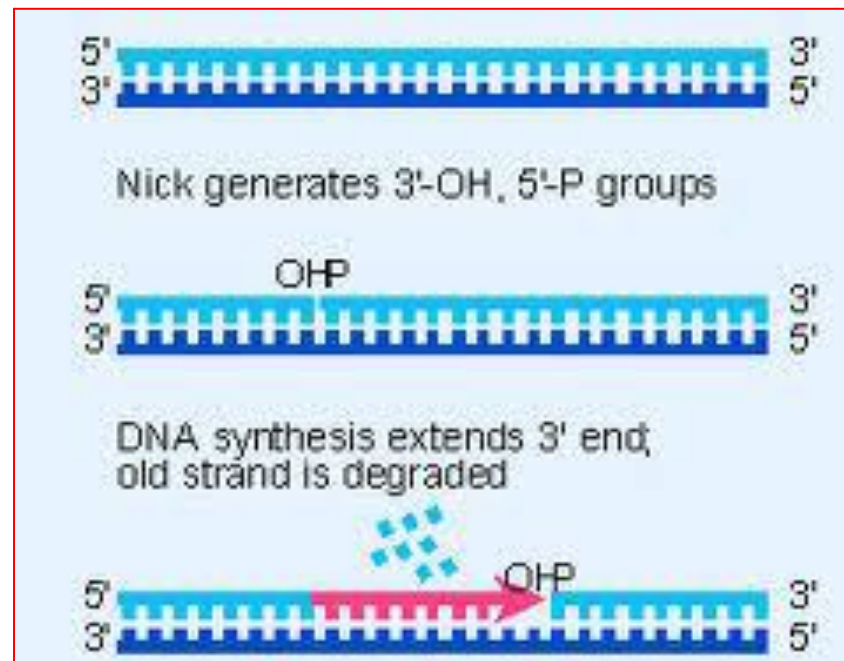
Si basa sull'ibridazione casuale di una miscela di tutti i possibili esanucleotidi alla forma **a singola elica** di un frammento di DNA sonda. Il filamento complementare è sintetizzato a partire dall'estremità -3'OH degli esanucleotidi che riescono ad appaiarsi alla sonda utilizzando l'attività polimerasica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



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 **steroidi** 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)

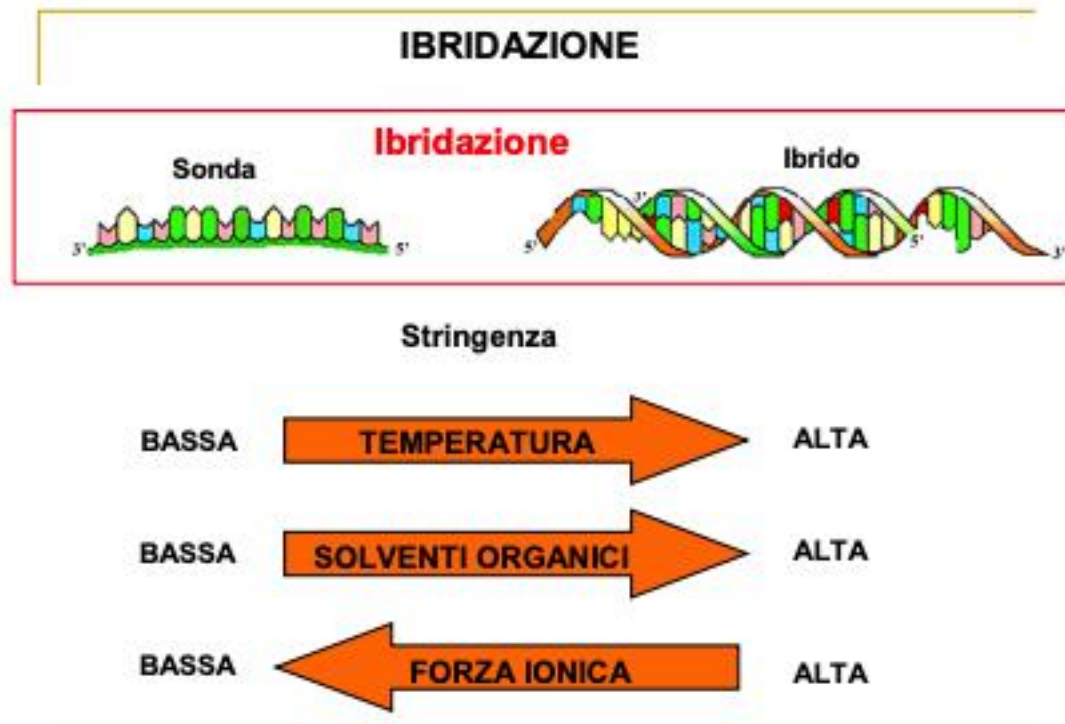
Agenti denaturanti: diminuiscono la temperatura di denaturazione della molecola ibrida formata da sonda e DNA bersaglio, quindi permettono di ridurre la temperatura di ibridazione.

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

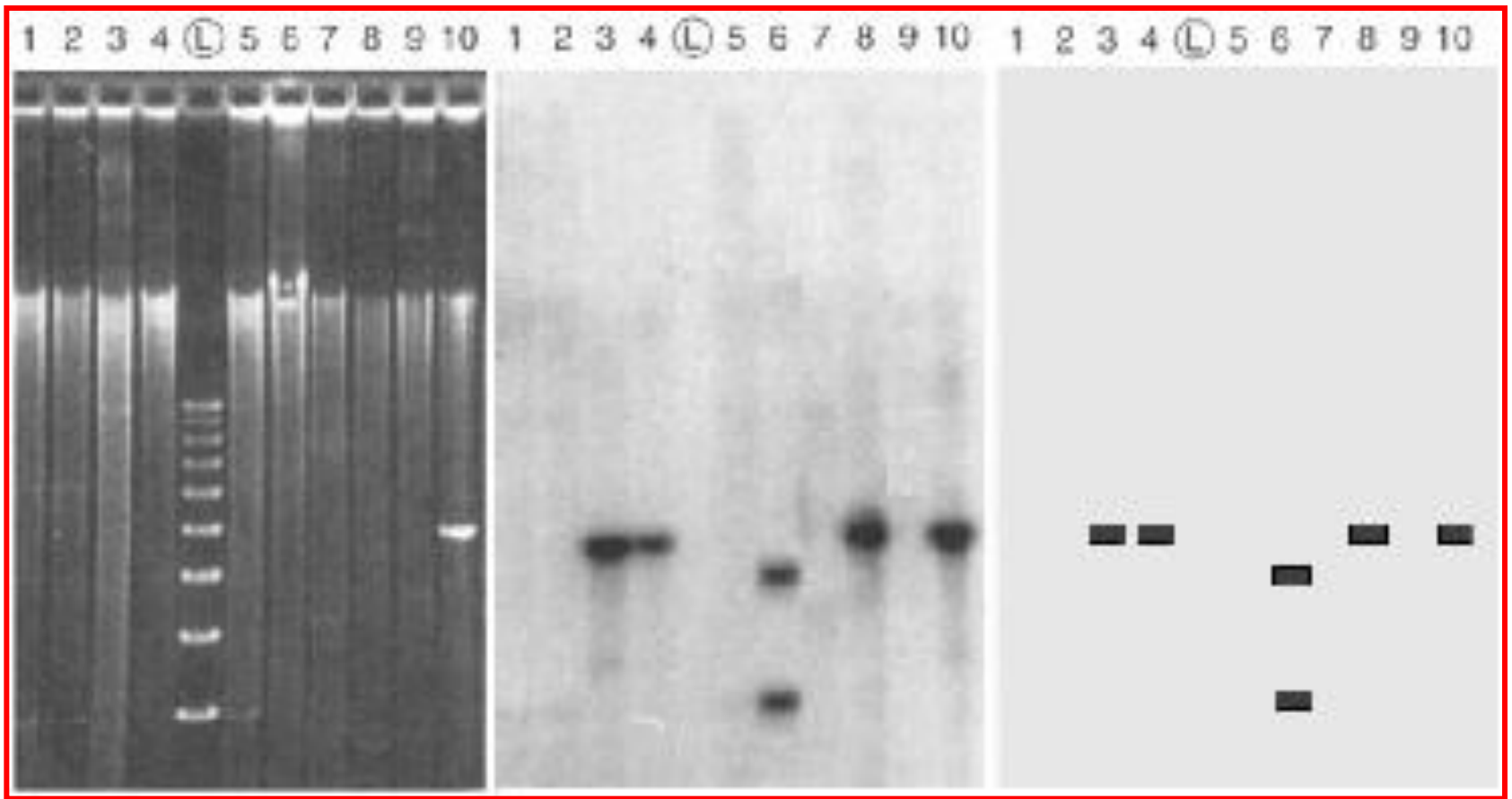
Controllo della Stringenza

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



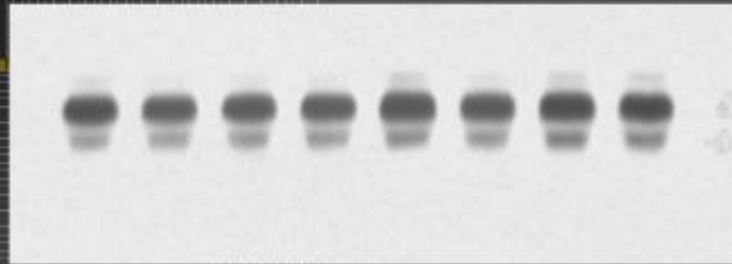
Gel con EtBr

**Lastra
autoradiografica**

schema

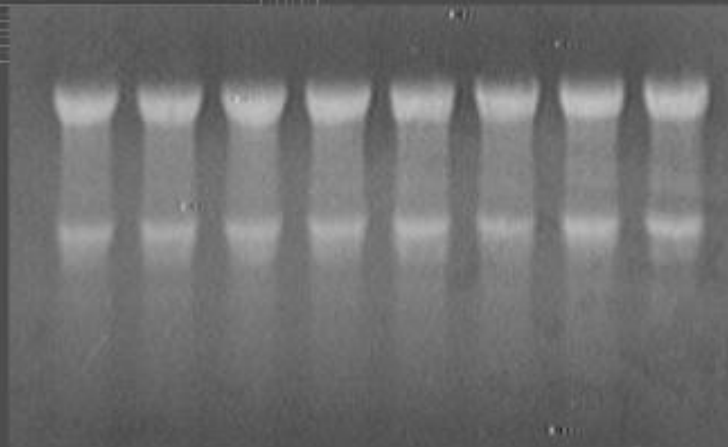
Un esempio di Northern Blot

Northern blot



Lastra
autoradiografica

RNA gel

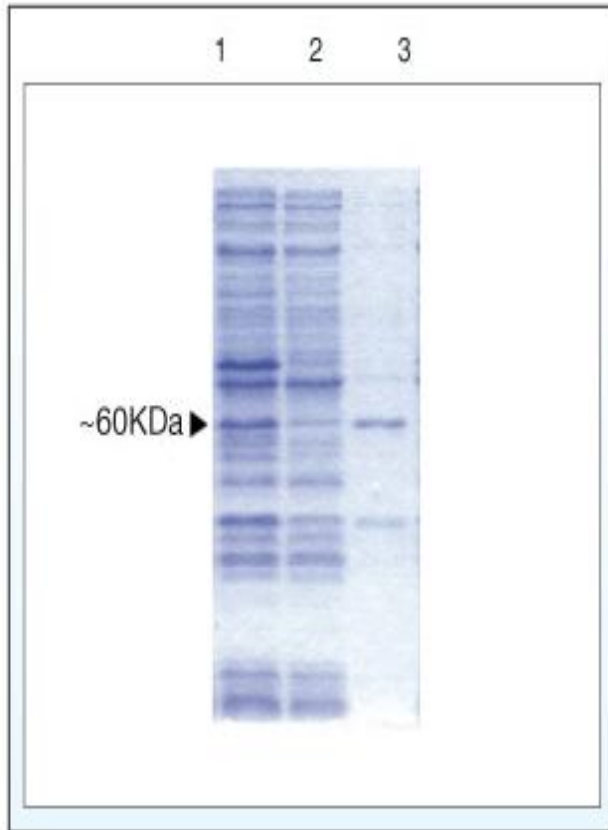


— 28 S
Gel con EtBr
— 18 S

Western Blot

B

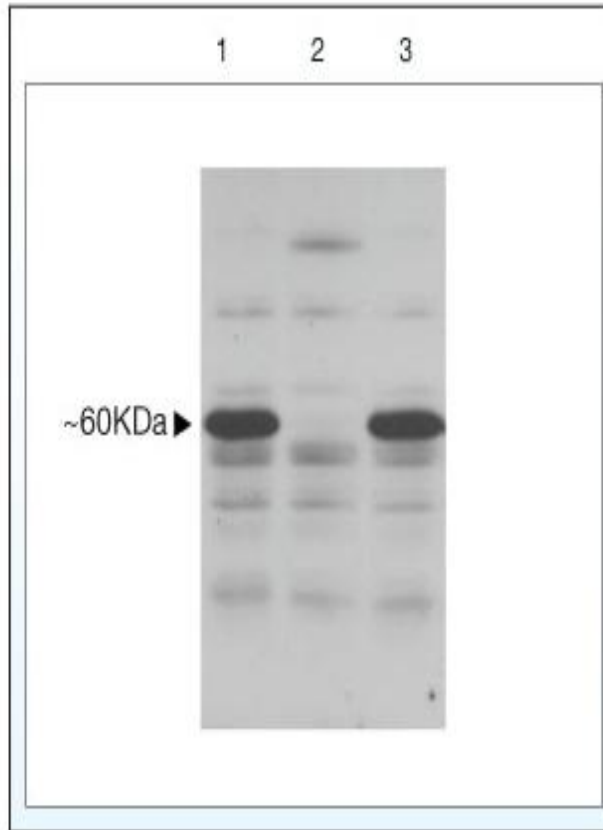
Gel colorato con Comassie blue



Gel con Comassie blu

C

Western Blot con un anticorpo specifico



**Lastra
autoradiografica**

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.**

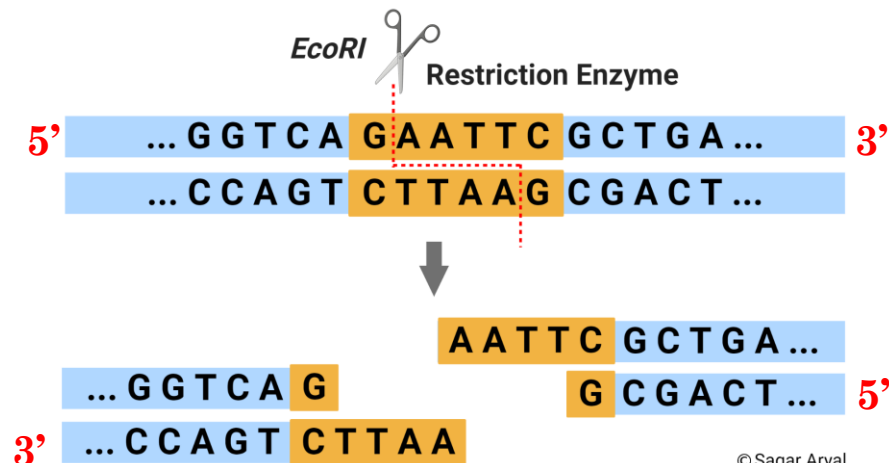
Nessuna delle due classi viene utilizzata in biologia molecolare a causa della loro **aspecificità di taglio.**

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.

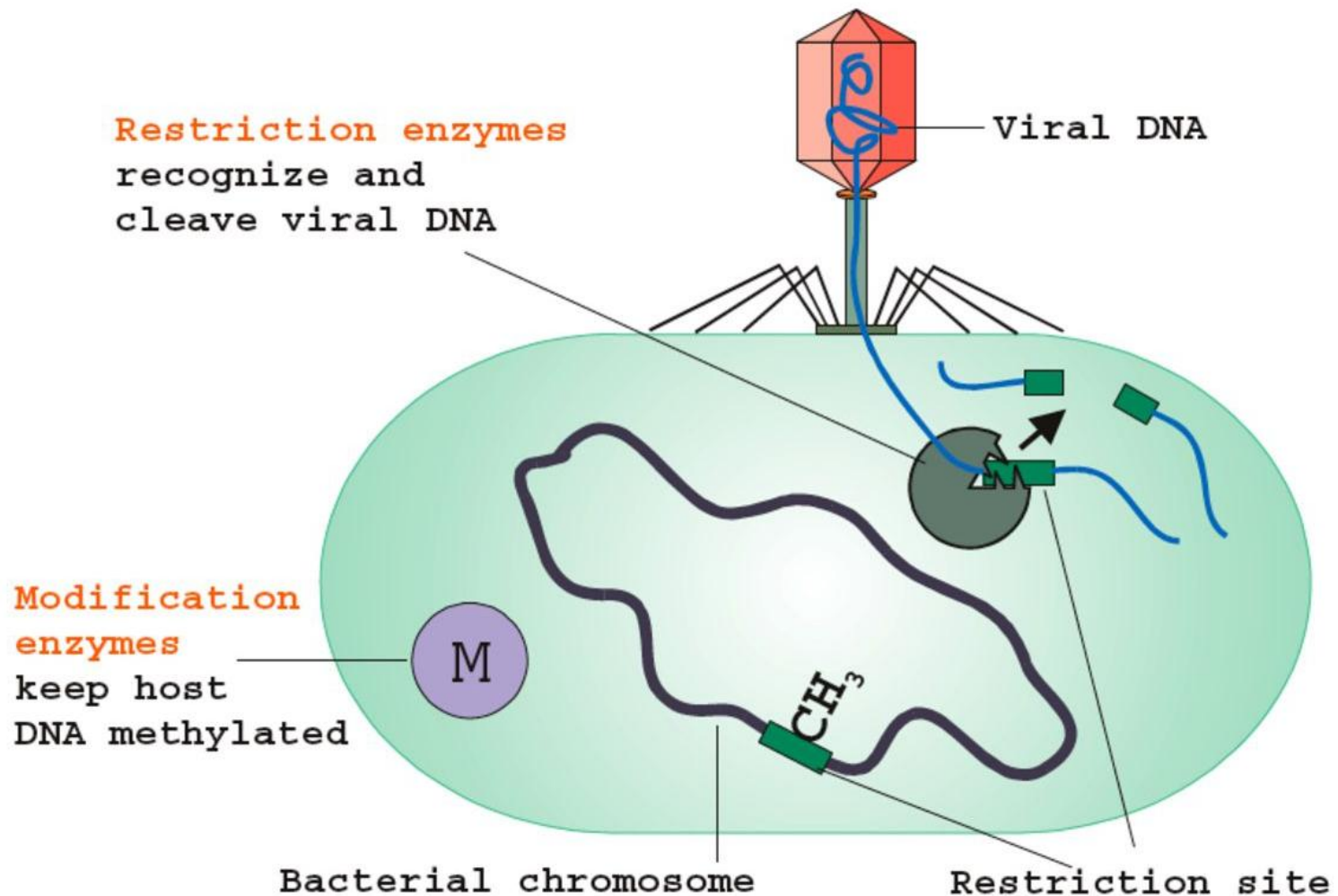
Gli ER riconoscono di solito sequenze **palindromiche**, tagliandole in posizioni specifiche. Un sito di riconoscimento palindromico è una sequenza in cui il filamento superiore e inferiore, **letti in direzione 5'-3'**, sono uguali. Per es. la sequenza:

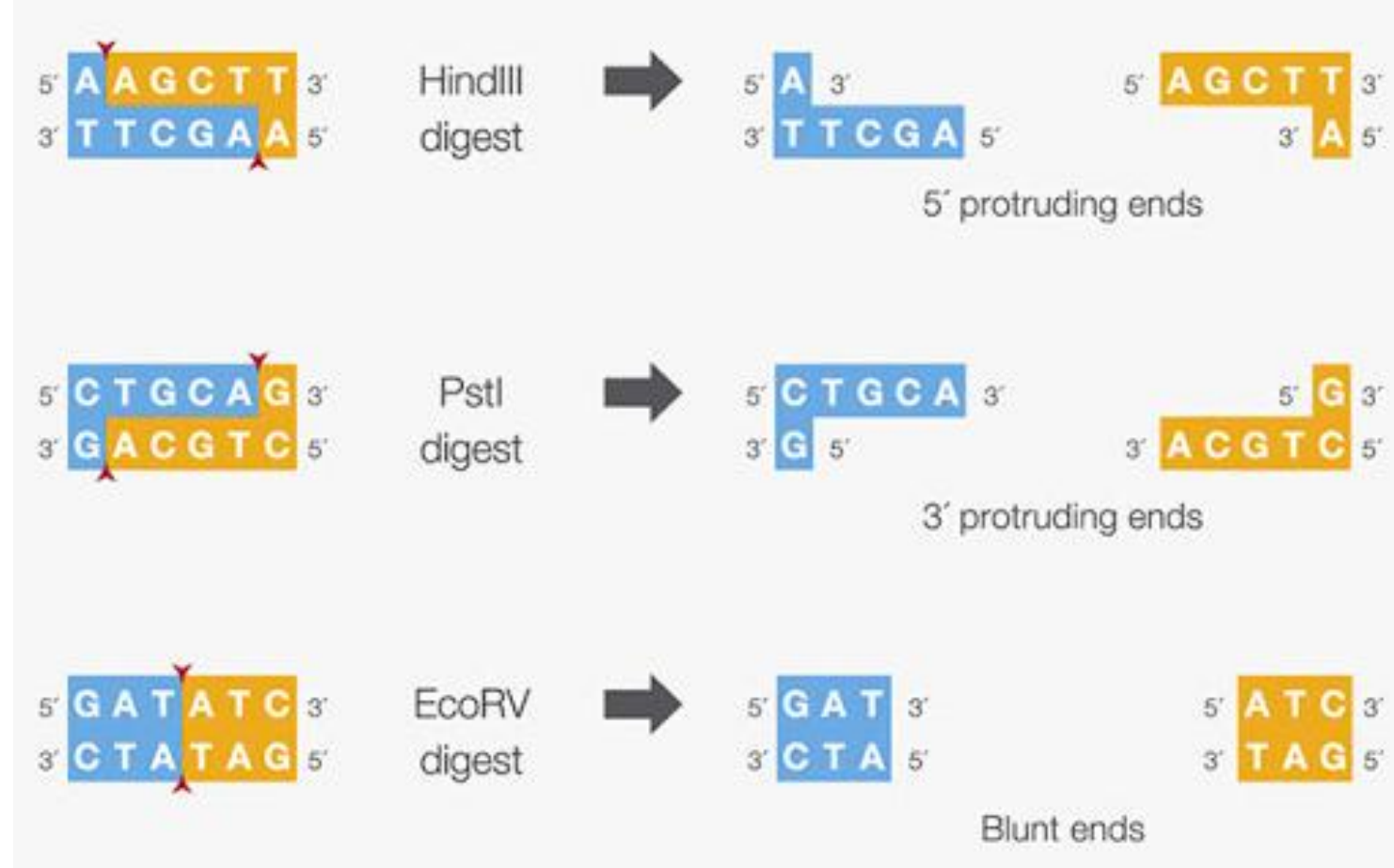


Gli enzimi di restrizione rappresentano il primo esempio di «strategia di sopravvivenza» al DNA esogeno dei microorganismi, poi utilizzato come metodologia di ingegneria genetica.

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.



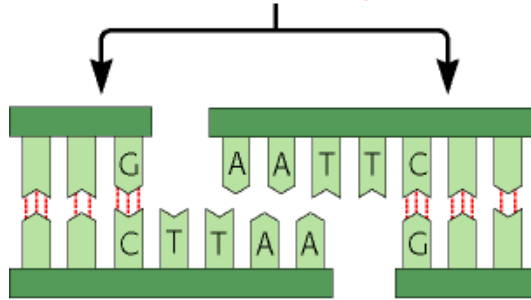
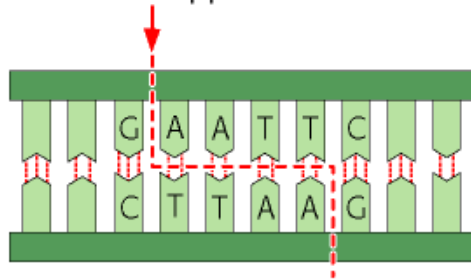


Il numero di basi riconosciute determina la frequenza media di taglio e la dimensione media dei frammenti generati. Enzimi che riconoscono sequenze più corte tagliano più frequentemente e quindi producono frammenti più numerosi e mediamente più corti, degli enzimi che riconoscono sequenze più lunghe.

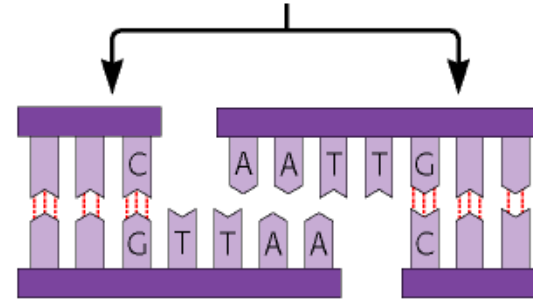
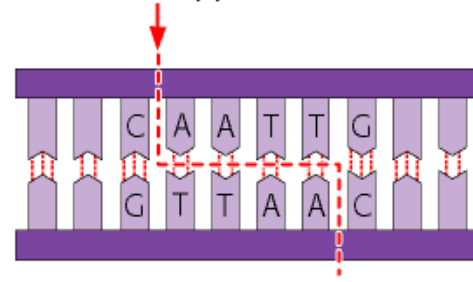
ER che hanno sequenza target di **4 bp** , riconoscono una sequenza target **ogni $1/4^4$**
ER che hanno sequenza target di **6 bp** , riconoscono una sequenza target **ogni $1/4^6$**
ER che hanno sequenza target di **8 bp** , riconoscono una sequenza target **ogni $1/4^8$**

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

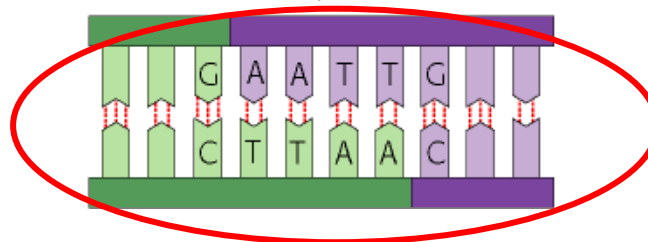
(b) EcoRI produce estremità appiccicose



MefI produce estremità appiccicose



Unione dei frammenti con estremità appiccicose complementari utilizzando la DNA ligasi



Il risultato però.....

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

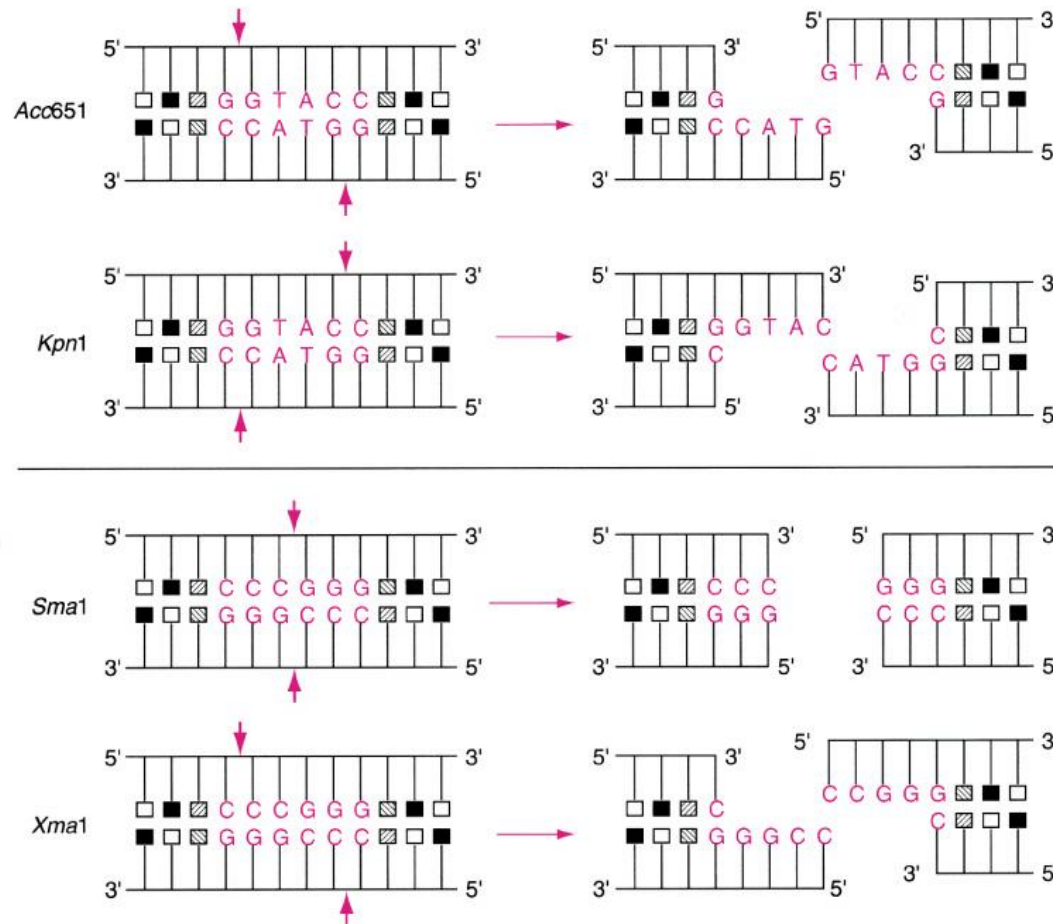
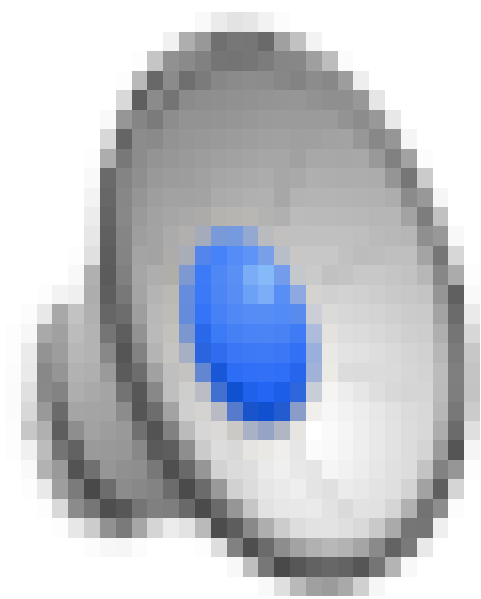
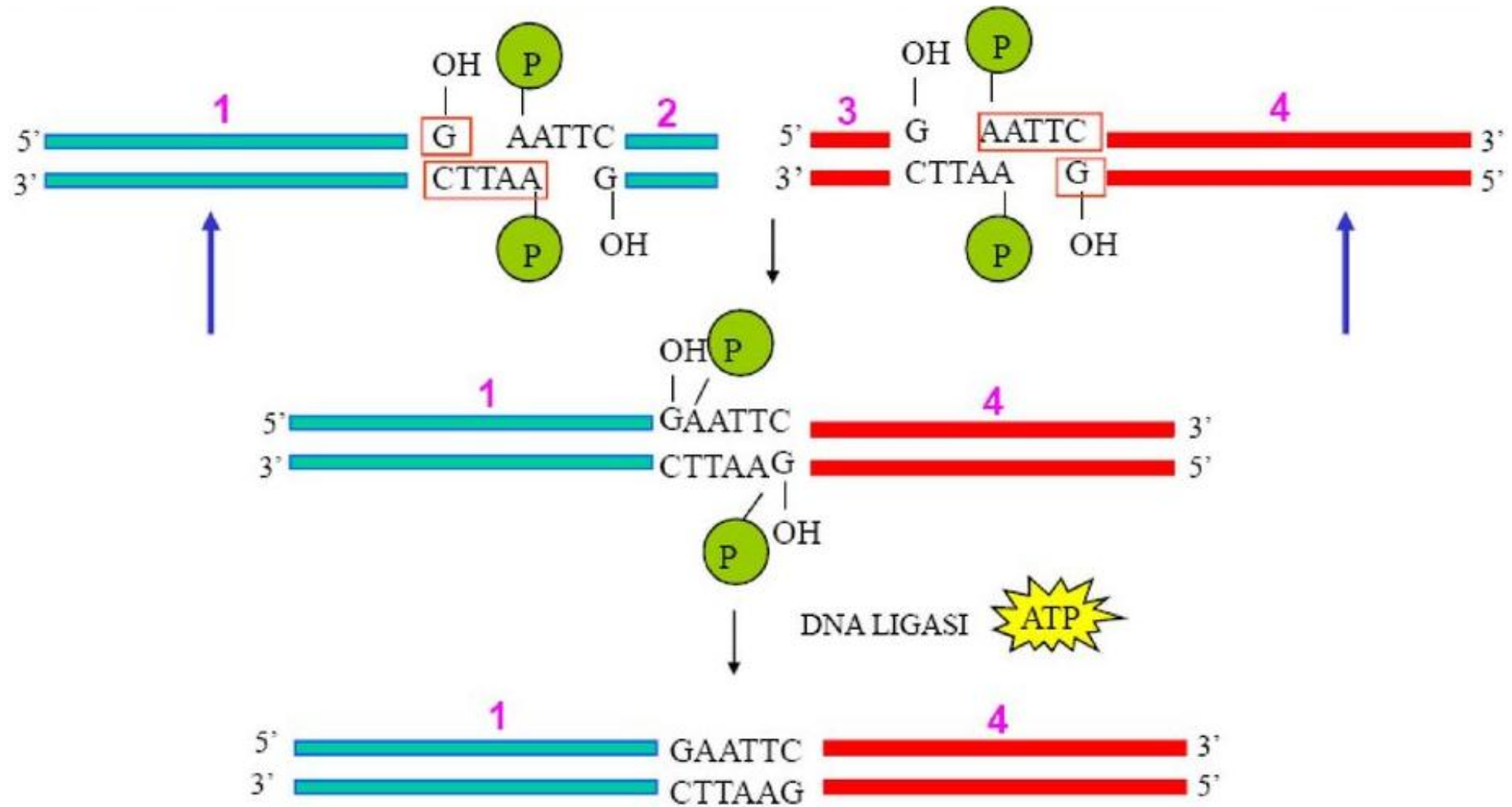


Figura 5.5 Isoschizomeri



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 $\geq 10\text{-}20 \text{ ng}/\mu\text{l}$

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

Vol. fin.= $10\text{-}20 \mu\text{l}$.

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

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.

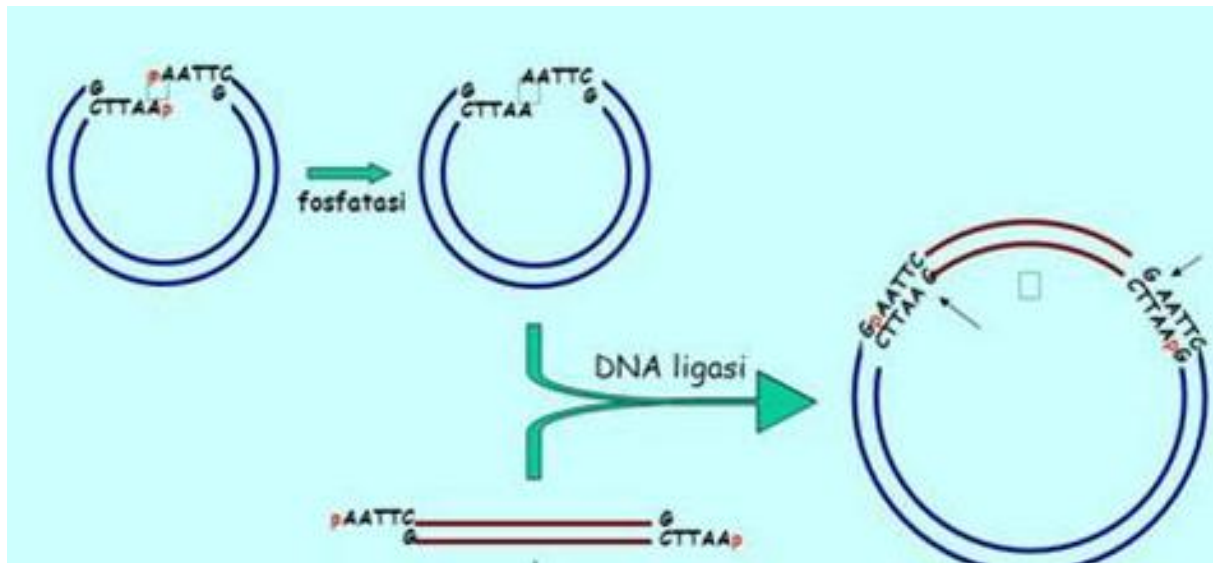
Rapporto I/V= 1:1 $50 \text{ ng}/10 \text{ kb} = x \text{ ng}/1 \text{ kb}$
 $x \text{ ng} = 50/10$
 $x = 5 \text{ ng}$

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.

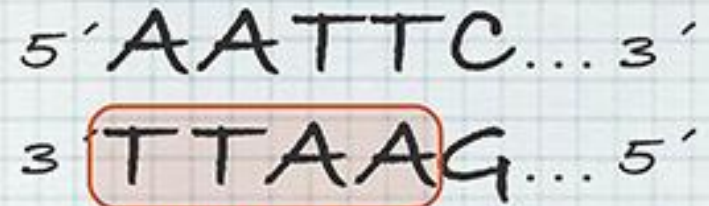
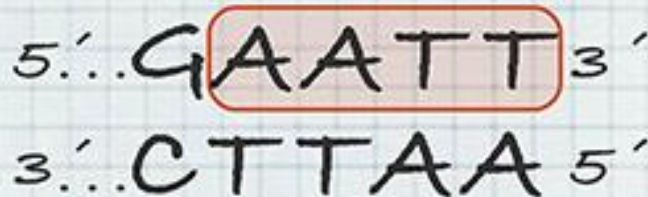
- Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con sticky ends 5'-protruding (es. EcoRI) **FILL IN**
- Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con sticky ends 3'-protruding (es. PstI) **TRIMMING**

Examples:

- T4 DNA Polymerase
- DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment

EcoRI-HF®

Fill in 5' → 3'



Fill in 5' → 3'

PacI

Degrade 3' → 5'

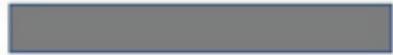


Degrade 3' → 5'

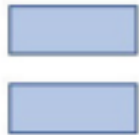
Linkers

Linker molecule with EcoRI site

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



Foreign DNA
(insert)



Linker molecules



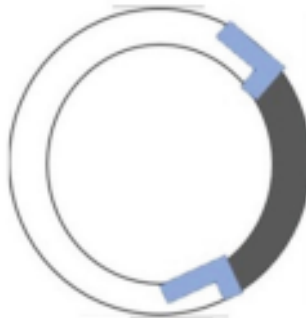
EcoRI



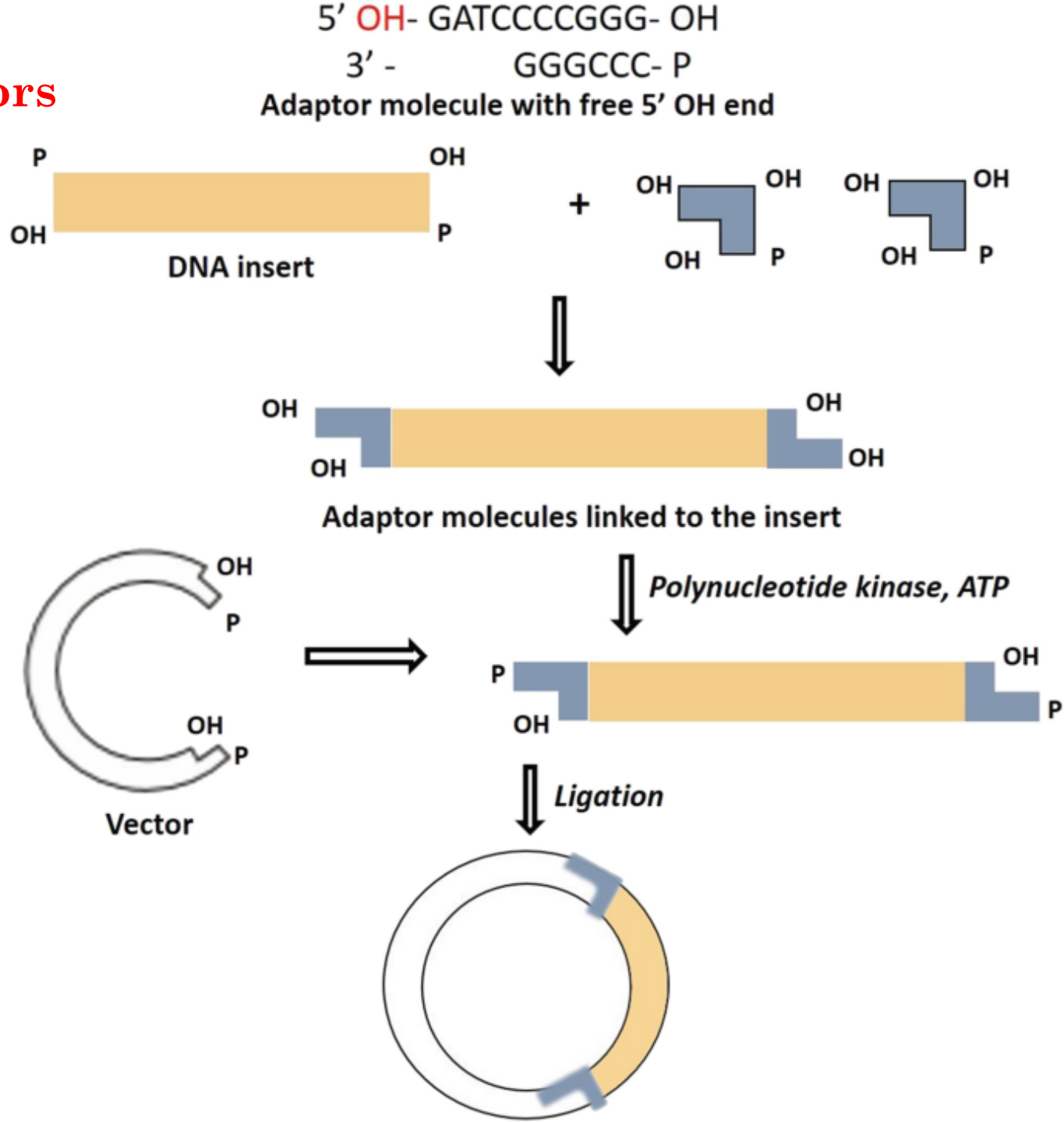
Vector cleaved with EcoRI



DNA ligase



Adaptors



	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 DIMERS	Linkers do not form dimers	Adaptors can form dimers

Meno 2!!!!!!!

