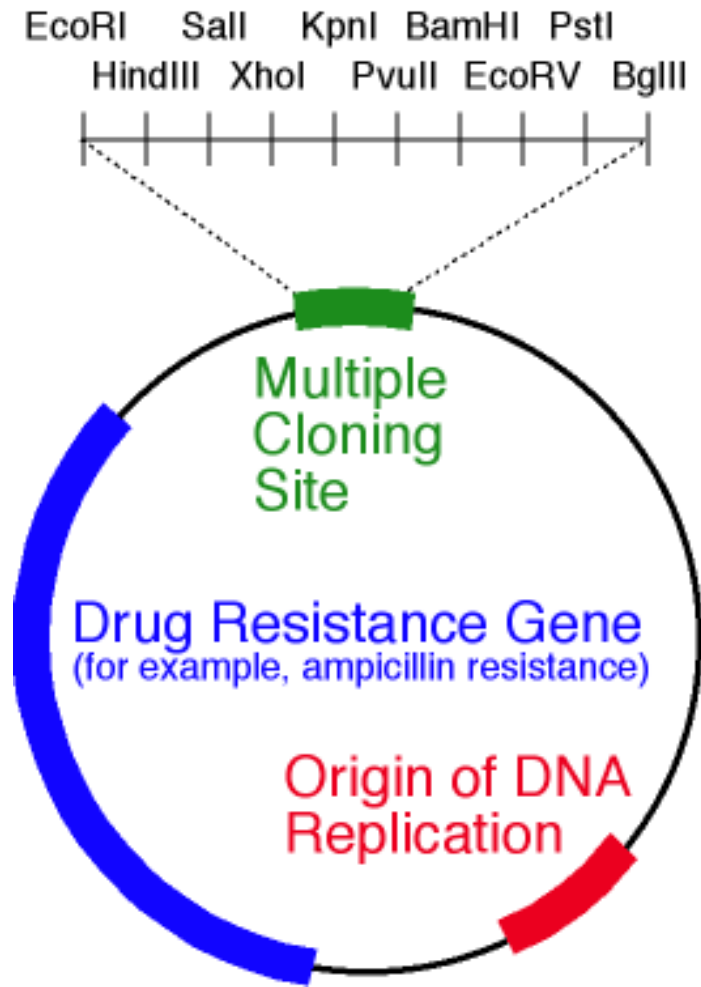


A top-down view of a petri dish containing a bacterial culture on a red agar medium. The culture shows numerous small, pinkish-red colonies, some of which are arranged in a grid-like pattern, suggesting a high-throughput screening or cloning experiment. The text "Tecniche e strategie di Clonaggio" is overlaid in white on the left side of the dish.

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**.

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.

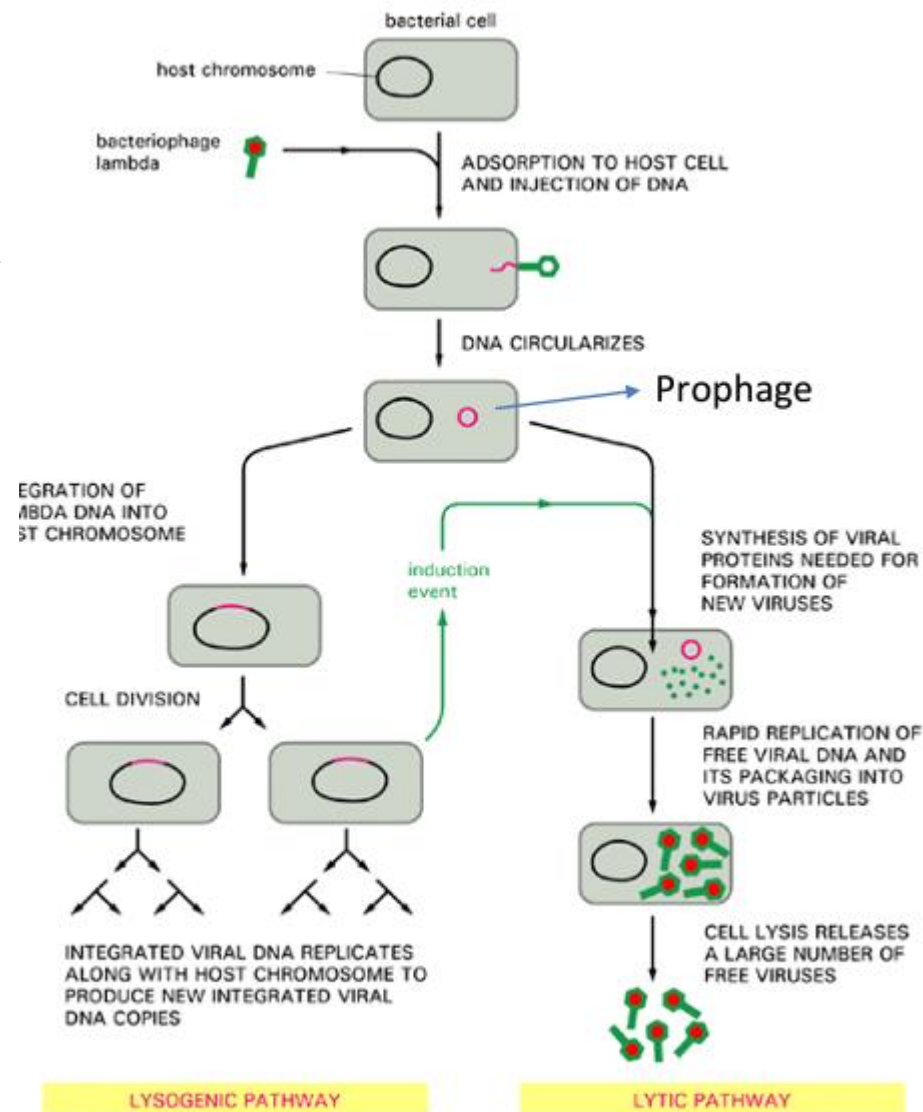
- **in maniera coordinata con la replicazione del cromosoma batterico**, generalmente quelli di grandi dimensioni, e si dicono a **controllo stringente**. In genere a basso numero di copie, codificano per proteine necessarie alla loro replicazione.
- **in maniera indipendente dalla replicazione batterica**,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

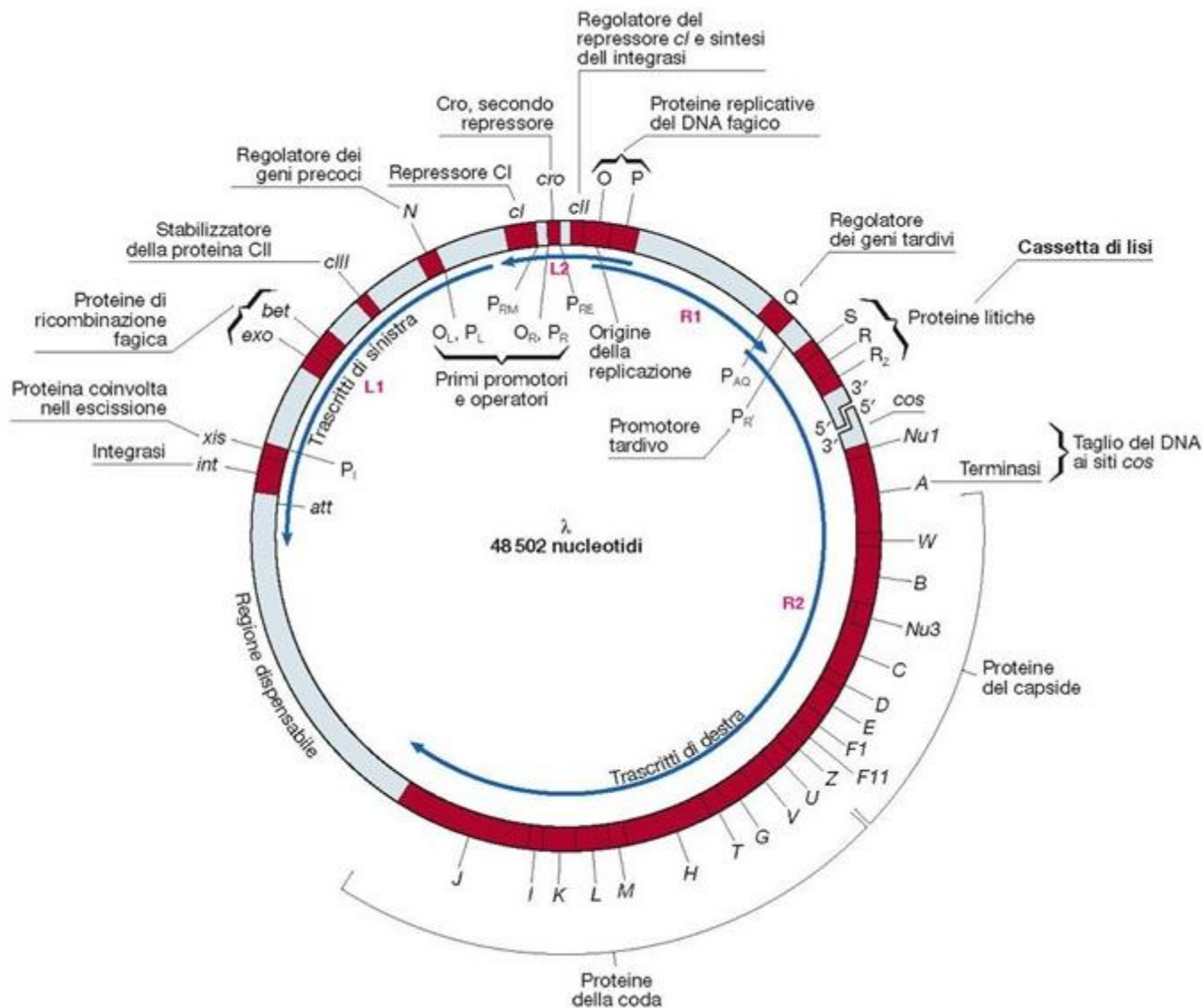
I vettori derivati dal fago λ

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

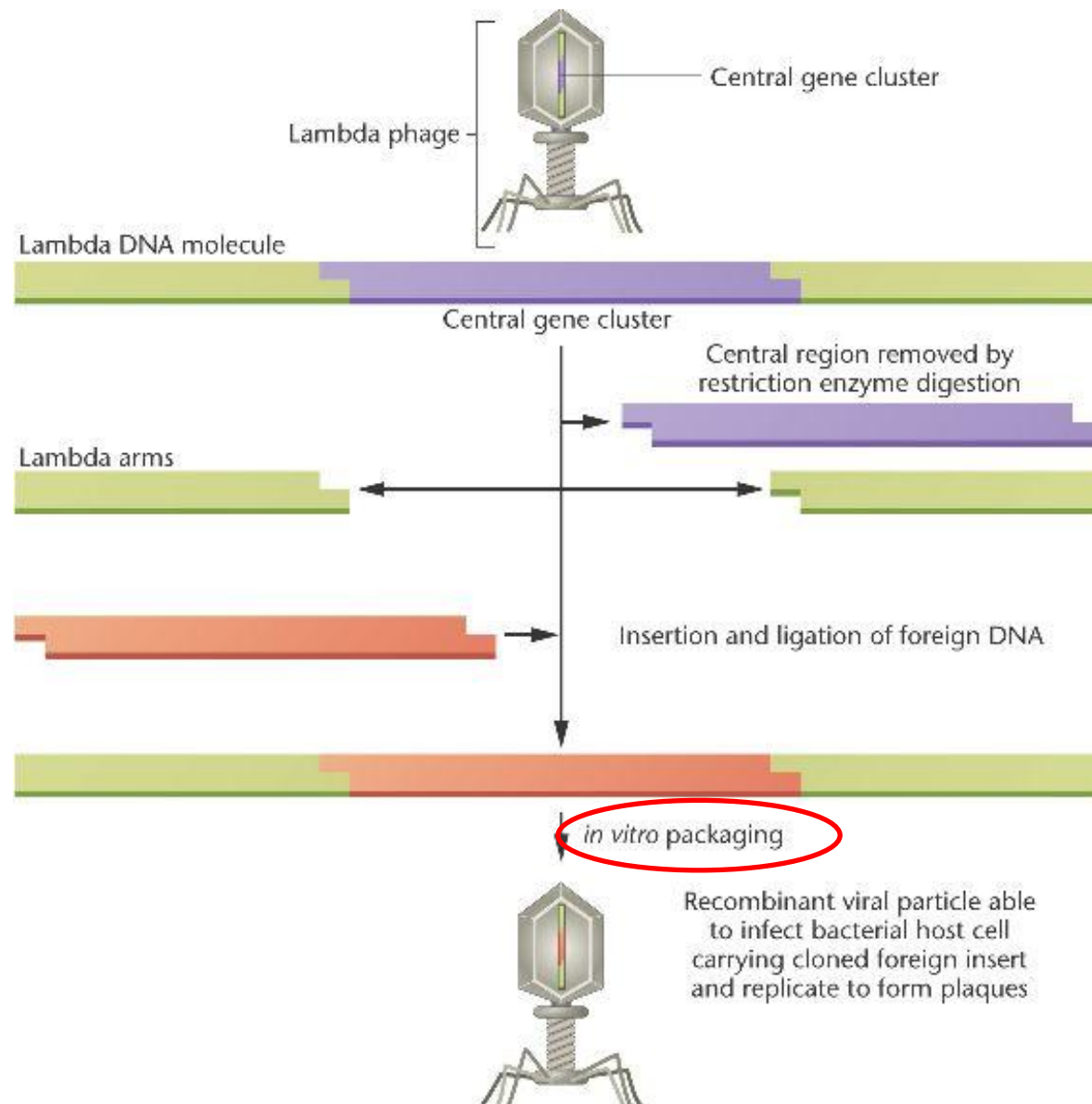
- durante un'infezione litica il DNA virale è introdotto, sotto forma di DNA lineare di circa 48.5Kb, all'interno della cellula batterica;
- una volta all'interno della cellula, il DNA fagico ricircolarizza, sfruttando le sue estremità coesive *cos*, e si replica come molecola circolare. Da un certo momento in poi, lambda comincia a replicarsi con una modalità di tipo “rolling circle”, cominciando a formare lunghi concatenamenti di singoli genomi fagici;
- 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*).
- infine viene assemblata la coda e i fagi lisano il batterio e fuoriescono.

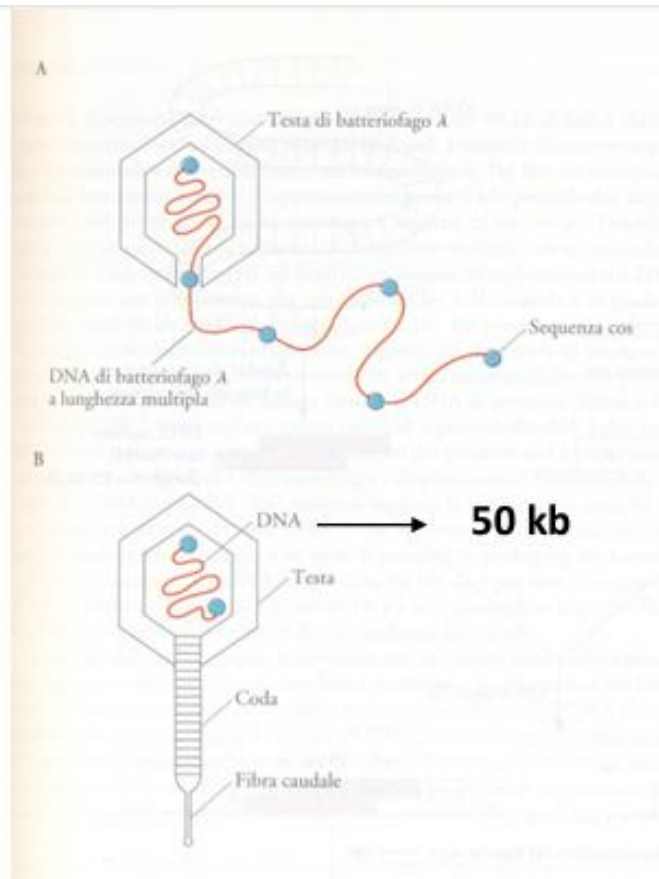


Genoma del fago λ



Clonaggio in λ





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.

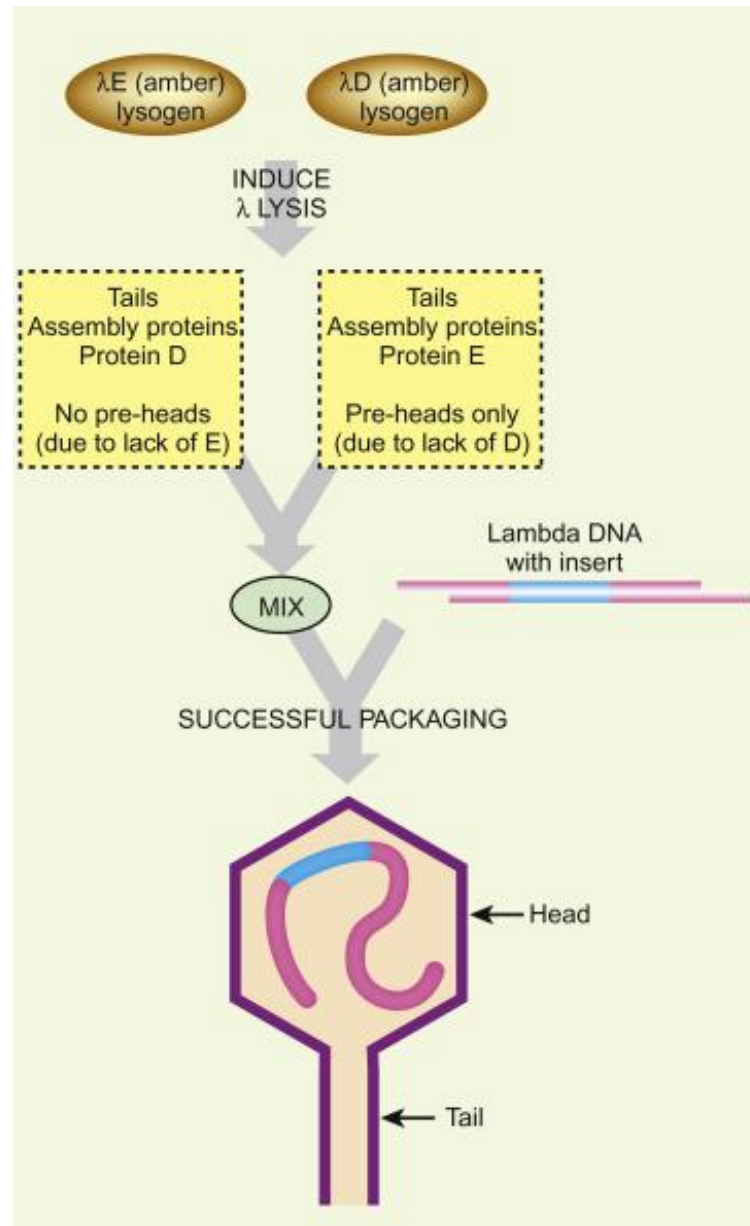
Il risultato sarà la produzione di placche di lisi, apparentemente simili a colonie batteriche.

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*

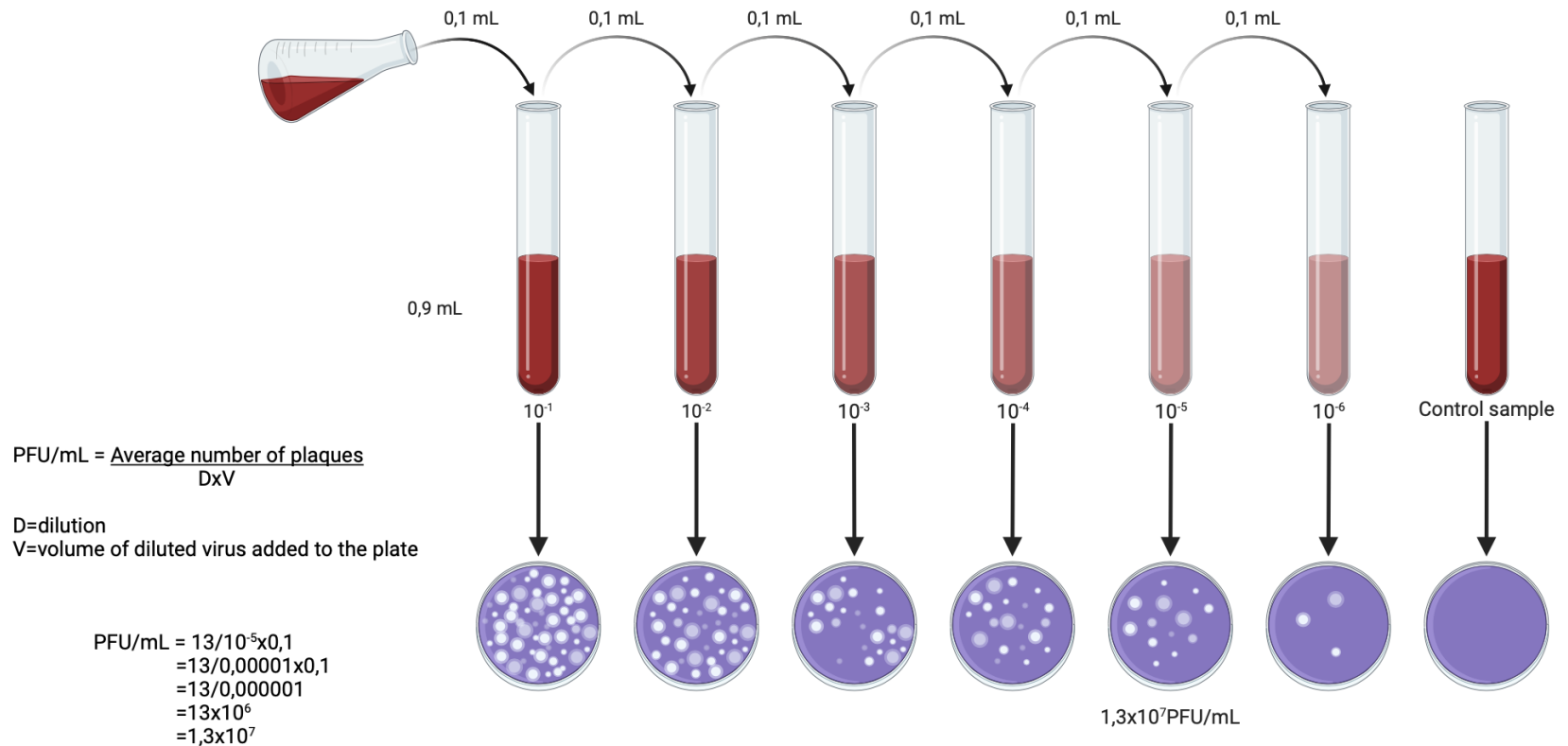
- ceppo BHB2688,
mancante della
proteina E,
necessaria per le
teste



- ceppo BHB2690,
mancante della
proteina D
necessaria per DNA
packaging

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.**

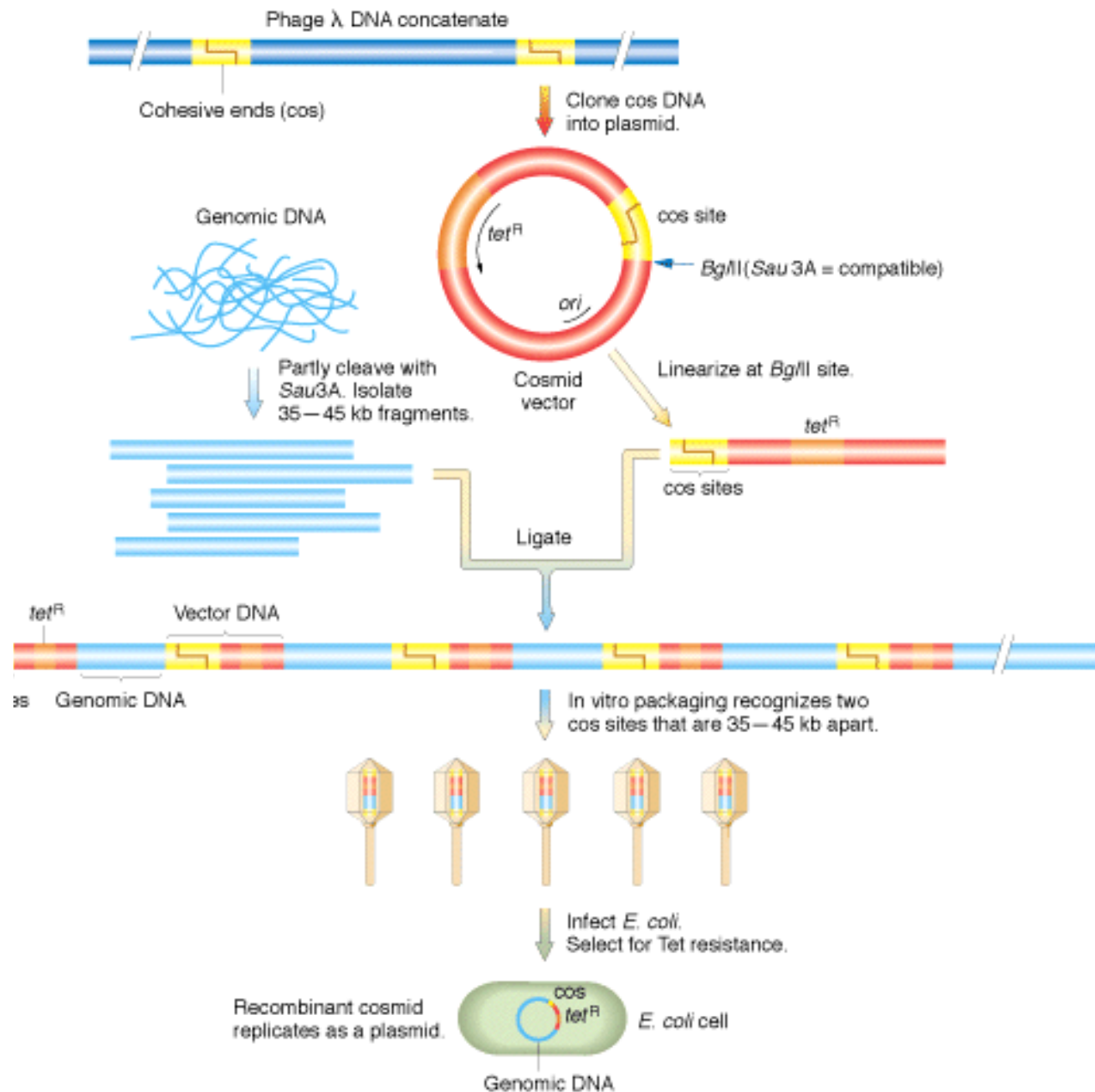


Cosmidi

Un cosmide, plasmide con marker selettivo, un ori, siti di clonaggio, **sequenze cos**. Insetto 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

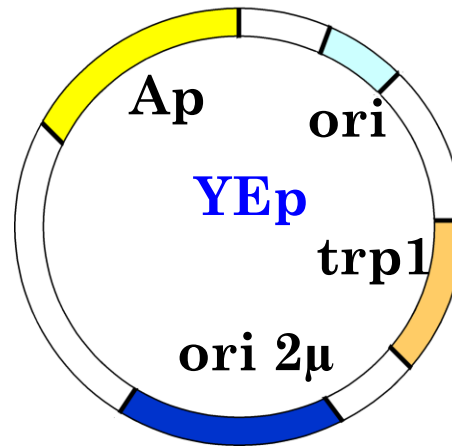
I vettori a replicazione autonoma assicurano **alte frequenze di trasformazione**.

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

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

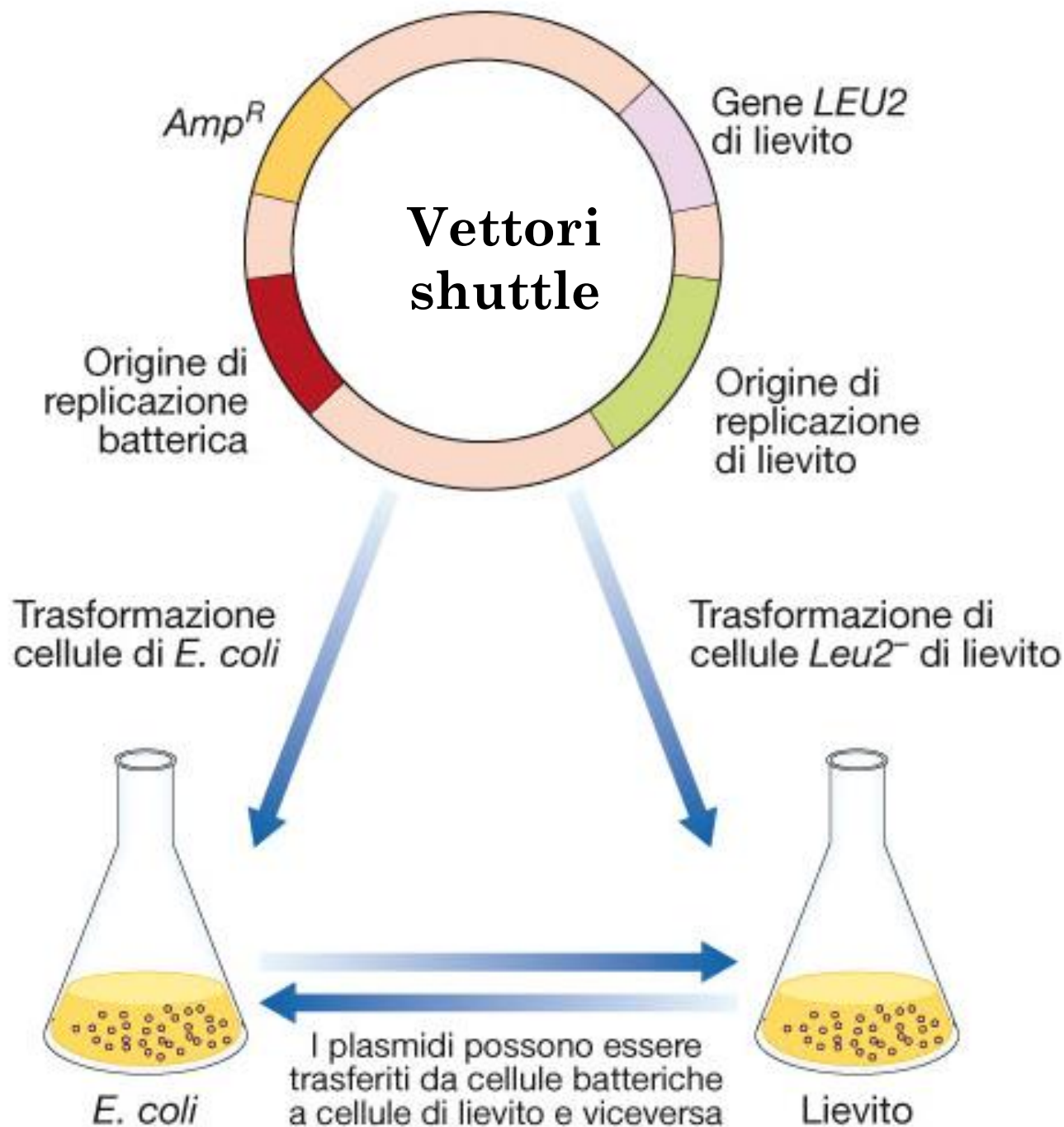
Marcatori di selezione dei vettori di lievito

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)**

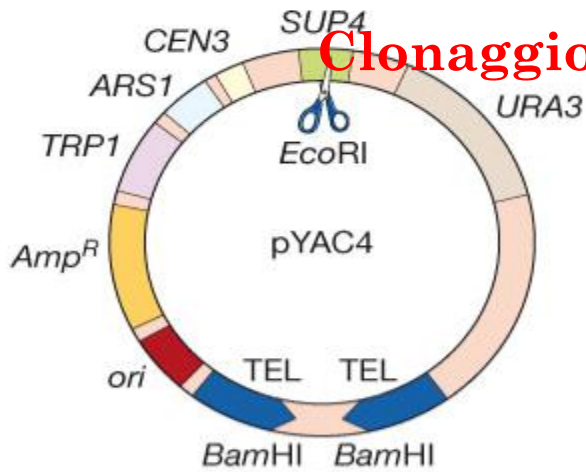
I vettori YAC possono accettare inserti grandi fino a **0,5-2Mb**, anche se l'efficienza di trasformazione è molto bassa. Vengono mantenuti e propagati in E.coli

Uno YAC è costituito essenzialmente da:

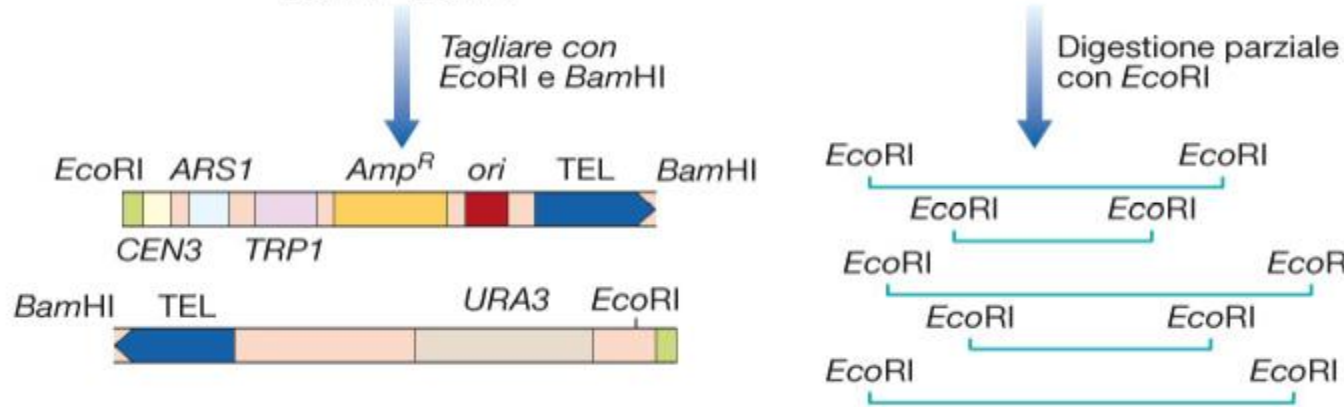
- **un centromero di lievito**
- **due telomeri di lievito**
- **un' origine di replicazione di lievito (ARS)**
- **uno o più siti unici per enzimi di restrizione**
- **un marcatore di selezione (di tipo auxotrofico)**

Clonaggio in vettori YAC

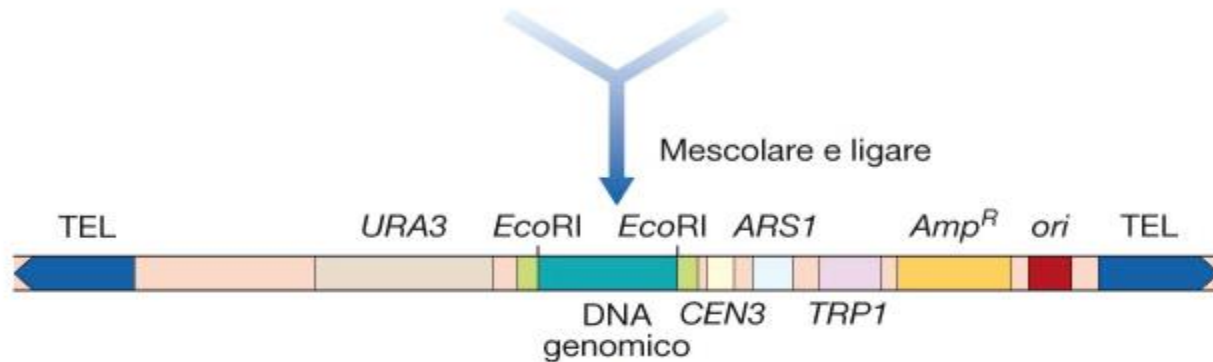
A



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

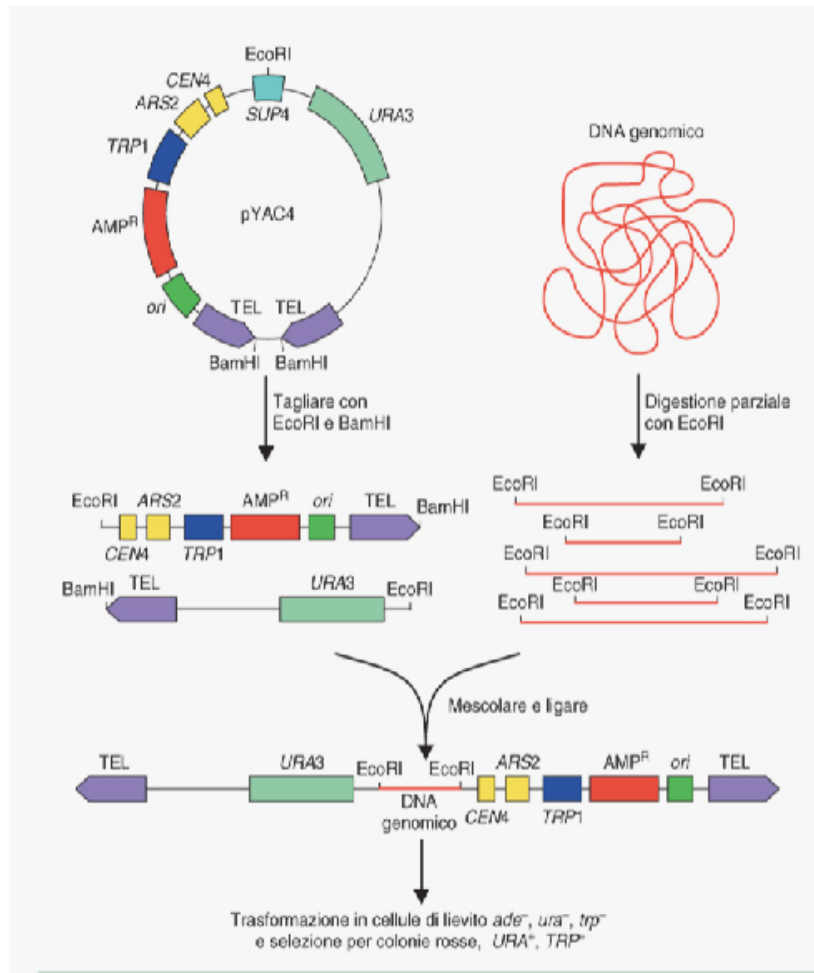
↓↓↓

colonie rosse (fenotipo mutante)

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

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

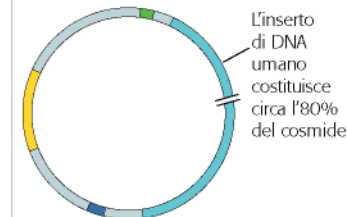
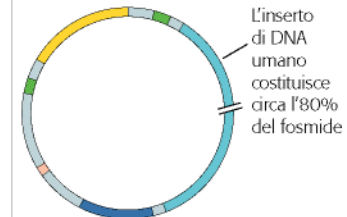
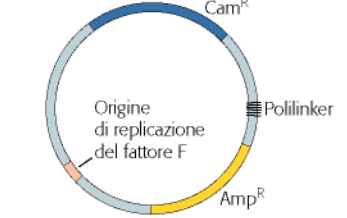
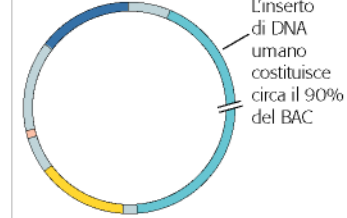
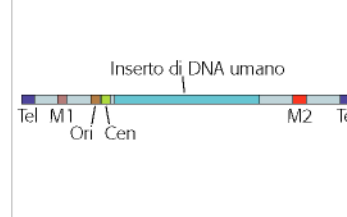
↓ SUP4

Colonie bianche
Non Ricombinanti

↓ ~~SUP4~~

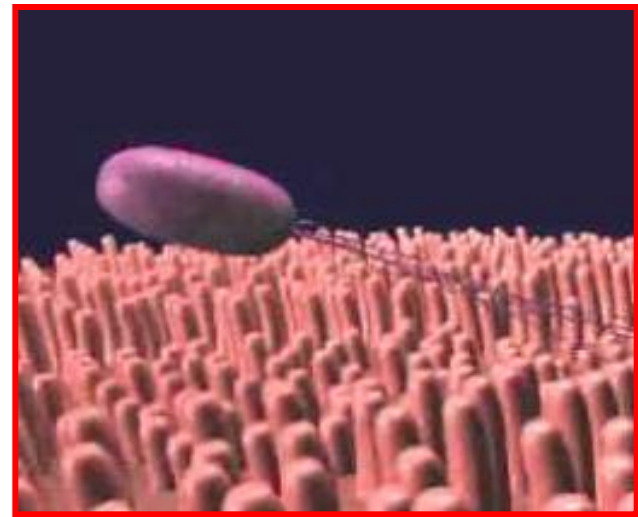
Colonie rosse
Ricombinanti

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		35-45 kb		50-100	~75 000
Fosmide		35-45 kb		Singola copia	~75 000
BAC		100-200 kb		Singola copia	15 000-30 000
PAC		100-200 kb		Singola copia	15 000-30 000
YAC		~200-1000 kb		Singola copia	~3000-15 000

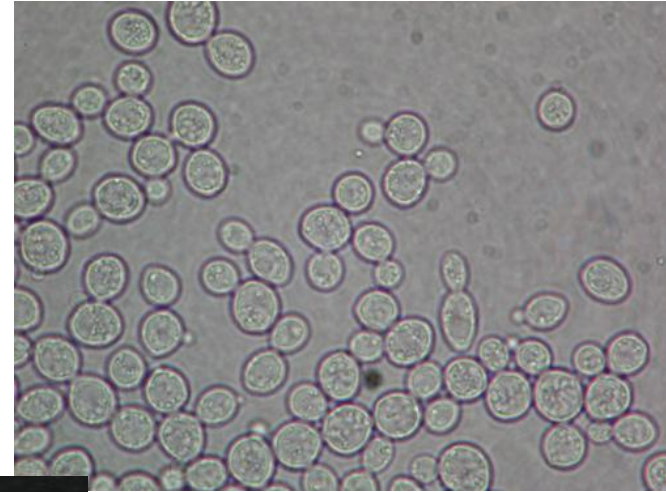
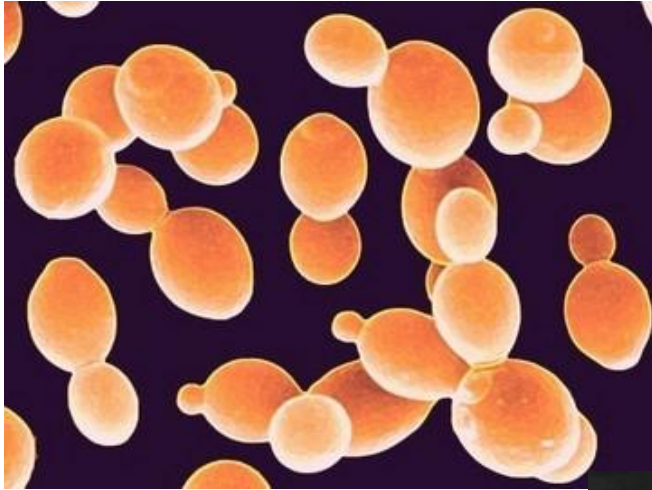
Il Primo Modello

Escherichia coli



Il Primo Organismo Modello eucariote

Saccharomyces cerevisiae

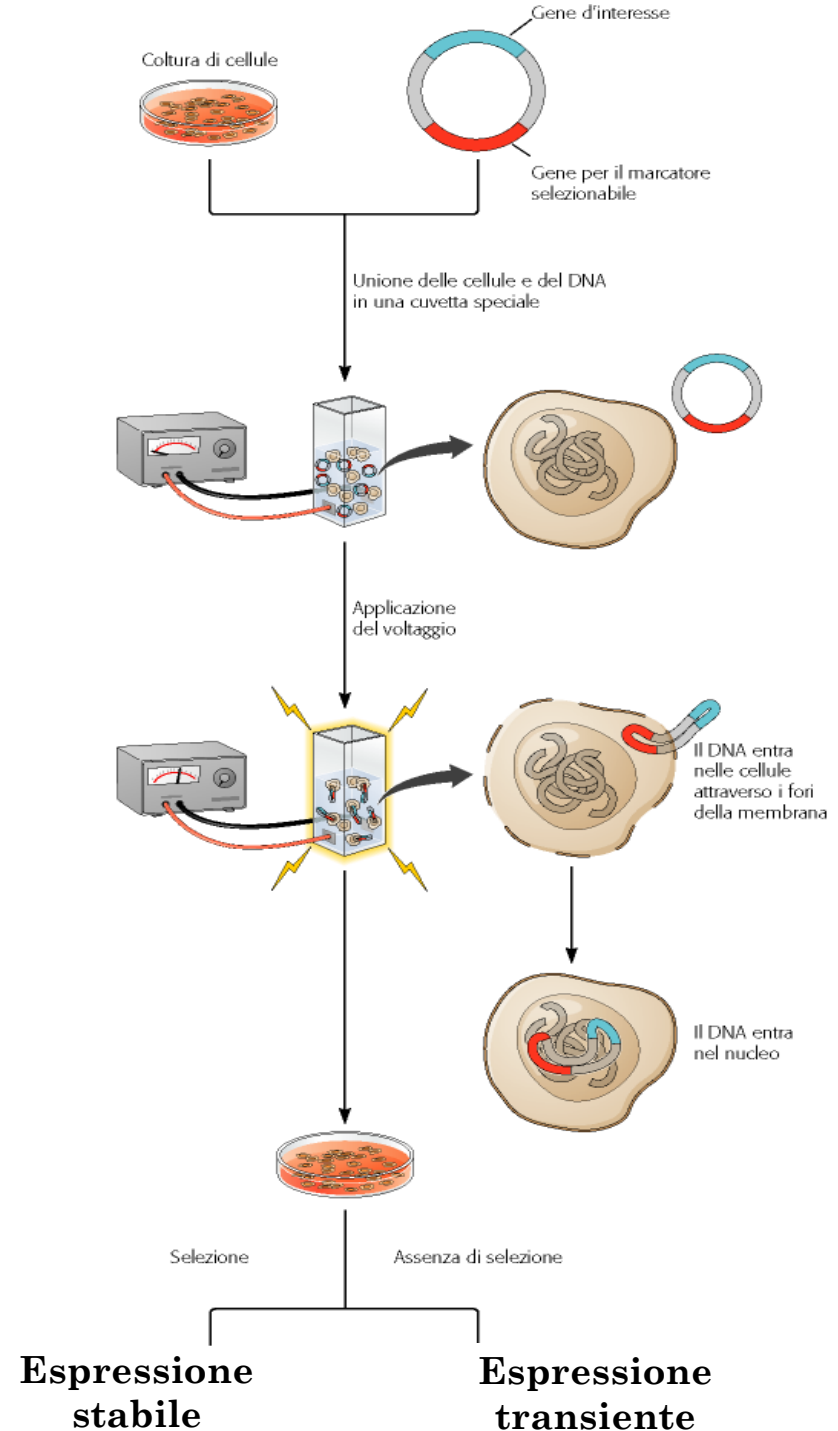


Trasferimento genico mediante elettroporazione

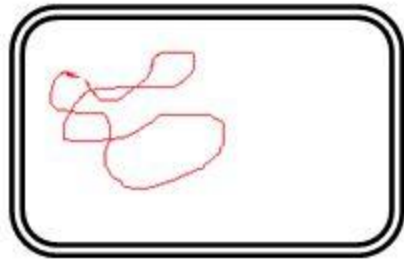
Le cellule, in una sospensione acquosa ad alta concentrazione, vengono incubate con il DNA e poste in una piccola cella con 2 elettrodi collegati ad uno speciale alimentatore. Un breve impulso elettrico, emesso tra i 2 elettrodi, induce l'apertura di piccoli fori sulla membrana cellulare.

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

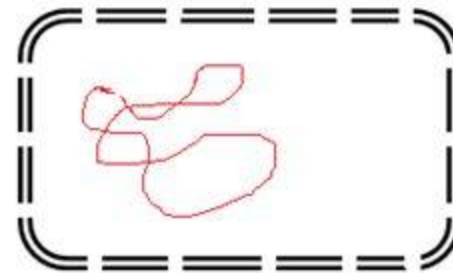
Le cellule possono essere poi utilizzate per esperimenti in transiente, o piastrate su terreno con antibiotico per selezionare i cloni positivi.



Trasferimento genico Cellule Ca competenti



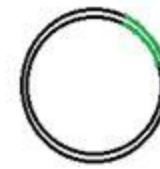
1. CaCl_2 treatment
To permeabilize the
bacterial cell membrane
2. Brief heat shock
to facilitate
The DNA up take.



Competent
Bacterial cell



Transformed bacteria



Recombinant Plasmid



Insertion

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:

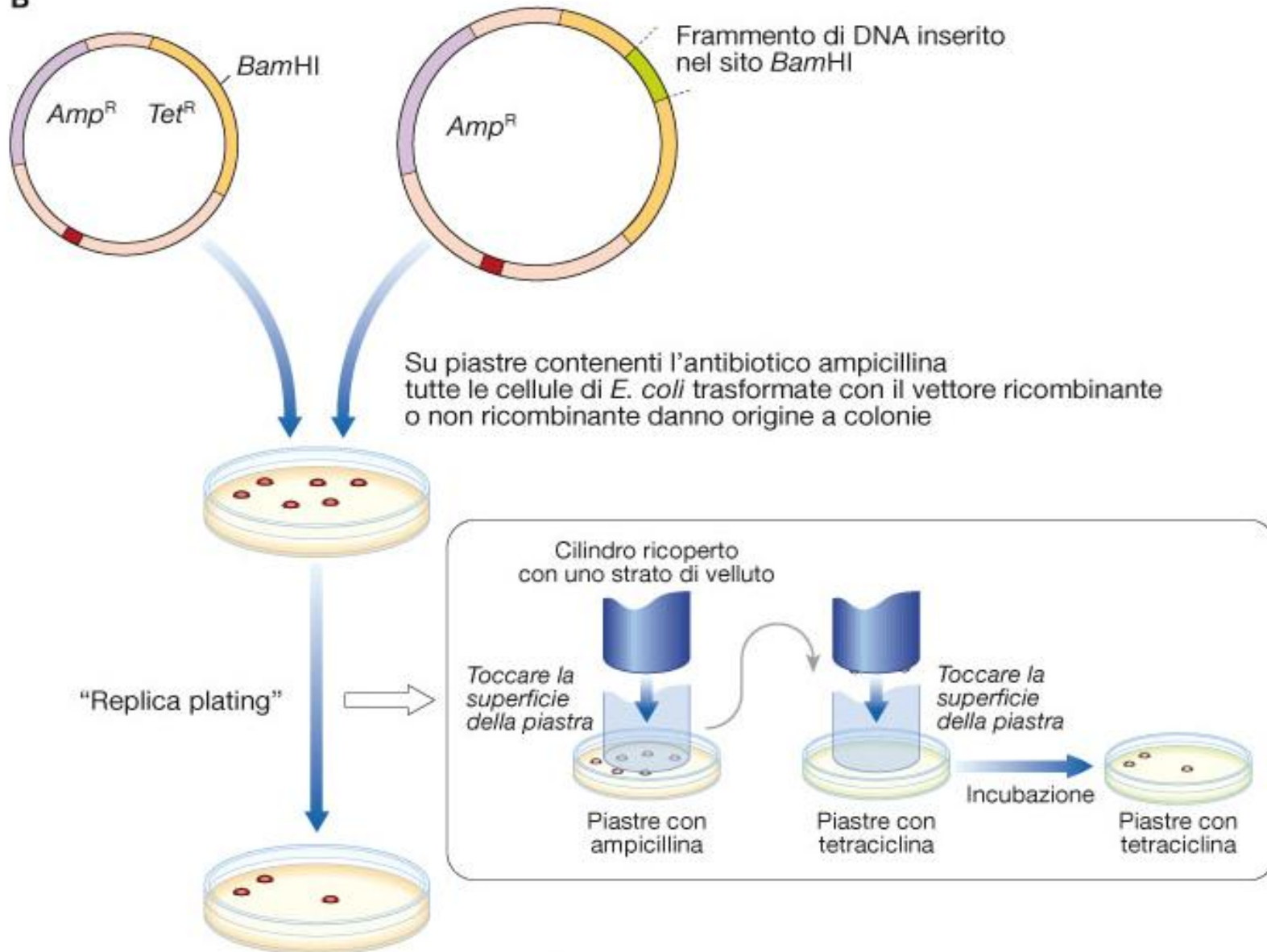
Ligazione del solo vettore

Vettore chiuso a concentrazione nota

Vettore digerito

Selezione di vettori ricombinanti

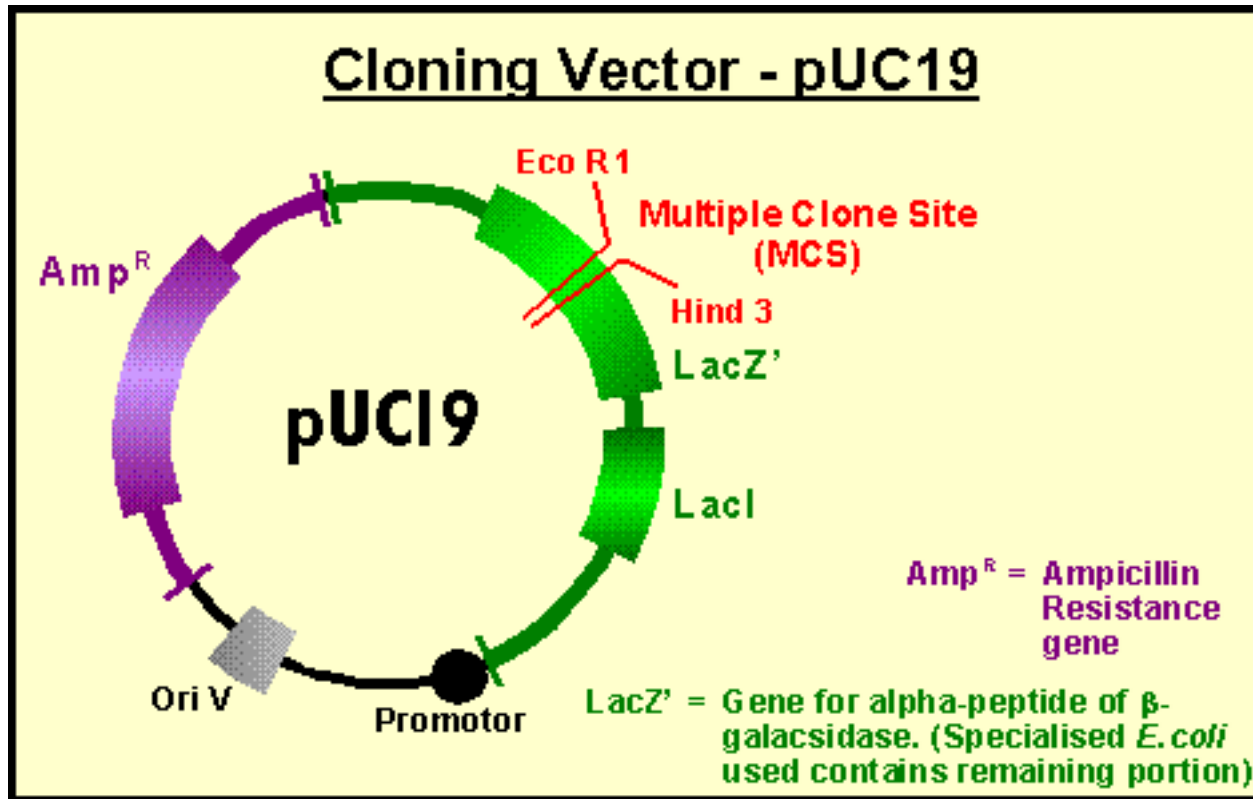
B



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.



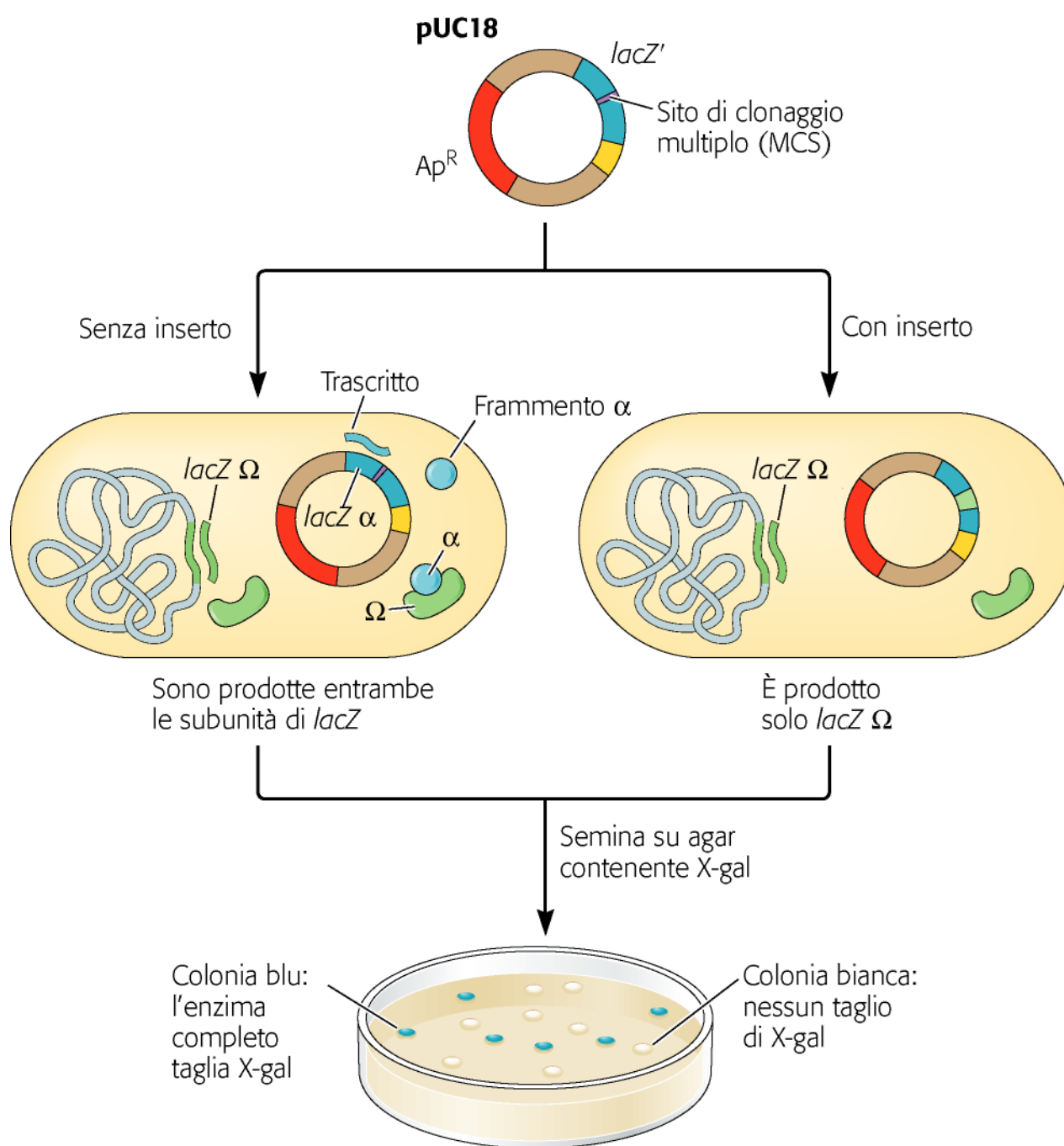
α -complementazione o Selezione bianco-blu

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.

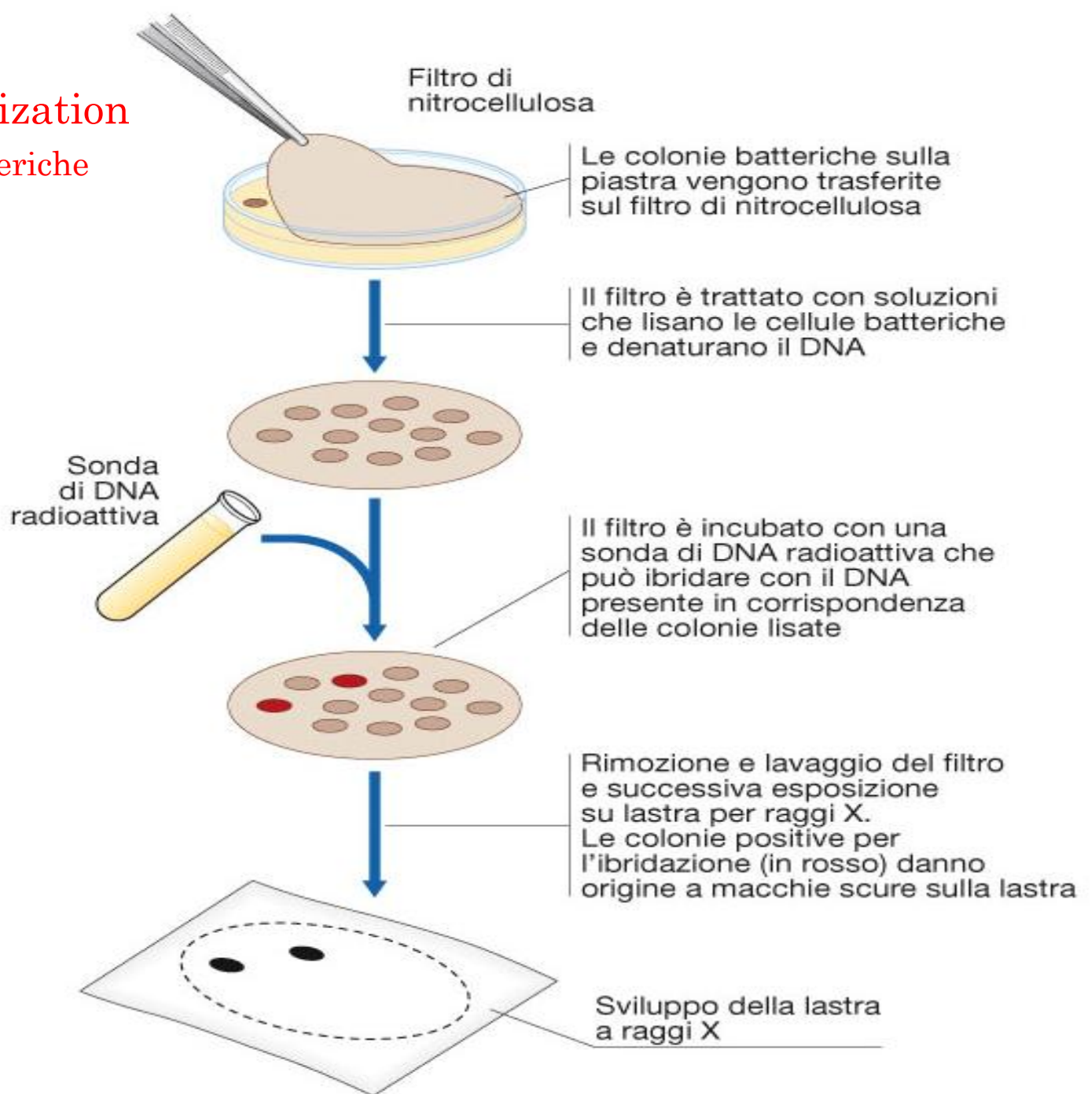
E.coli strains: F- **ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)** U169 recA1 endA1 hsdR17



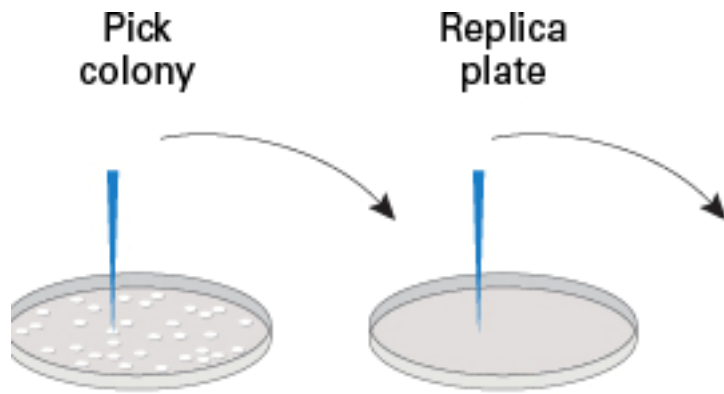


Colony hybridization

Su colonie batteriche

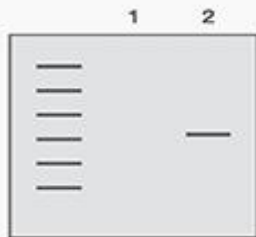


PCR su Colonia



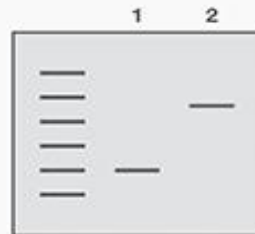
- Si preleva qualche cellula da ogni singola colonia, la si replica su piastra e poi la si risospende in H₂O
- Si fa una reazione di PCR per ogni clone, aggiungendo alla mix di PCR qualche μ l della sospensione batterica.
- Si amplifica con **una coppia di primers specifica per l'inserto, o per il vettore**

Insert-specific primers



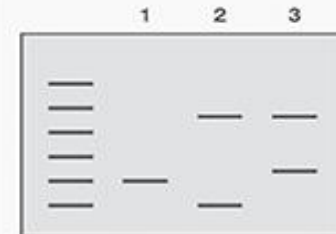
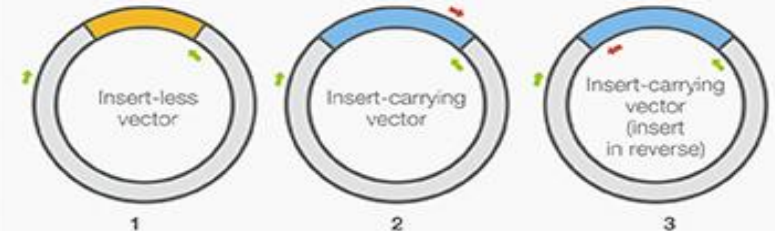
Positive amplification confirms the insert's presence.

Vector-specific primers



Amplicon length determines the insert's presence.

Insert- and vector-specific primers



← Amplicons from vector-specific primers
← Amplicons from the vector-specific and insert-specific primers

PCR analysis (insert detection and amplicon lengths) reveals cloning success.

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**

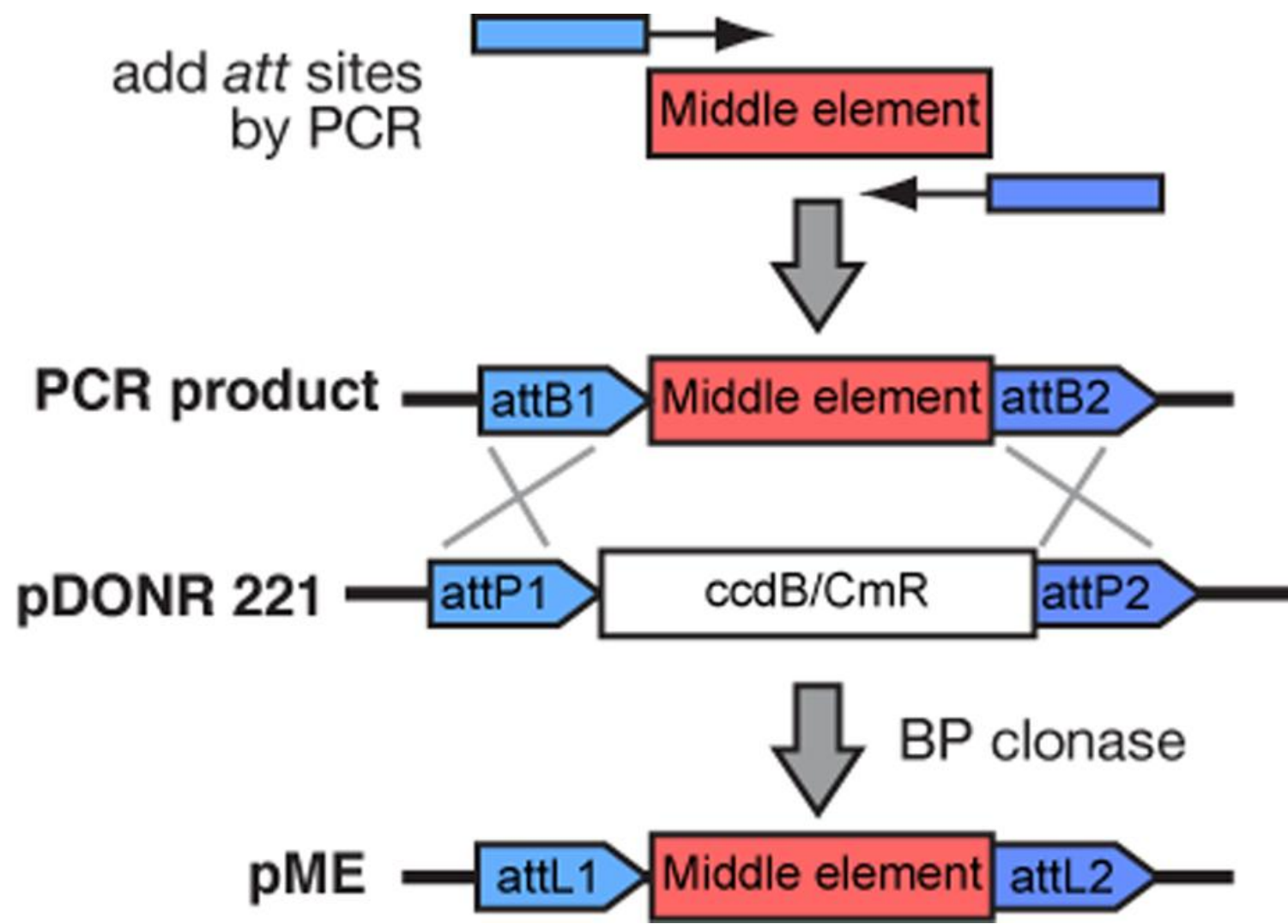
Lambda integration into the *E.coli* chromosome occurs via intermolecular DNA recombination that is mediated by a mixture of lambda and *E.coli*-encoded recombination proteins

- 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

CCCCCTGTTCAAACATGTTT GTACAAAAAAGCAGGCT-----ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCCC

PCR PRODUCT

CCCCCTGTTCAAACATGTT TT TT CGTCCGA-----TGGGTCGAAAGAACATGTTTCACCAGGGGG

attB1

attB2

X

Donor

Vector

Vector--N75-CCAACTTTGTACAAAAAAGCTGAAC-N100-----N100-GTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGG-N75---Vector

ccdB-CmR

Vector--N75-GGTTGAAACATGTTT TTTCGACTTG-N100-----N100-CAAGTCAAAGAACATGTTTCAACC-N75---Vector

attP1

attP2



BP Clonase

Entry clone

Vector--N75-CCAACTTTGTACAAAAAAGCTAGGCT-----ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGG-N75---Vector

PCR PRODUCT

Vector--N75-GGTTGAAACATGTTT**TTTCGTCCGA**-----**TGGGTCGAAAGACATG**GTTTCAACC-N75---Vector

attL1

attL2

+

By- product

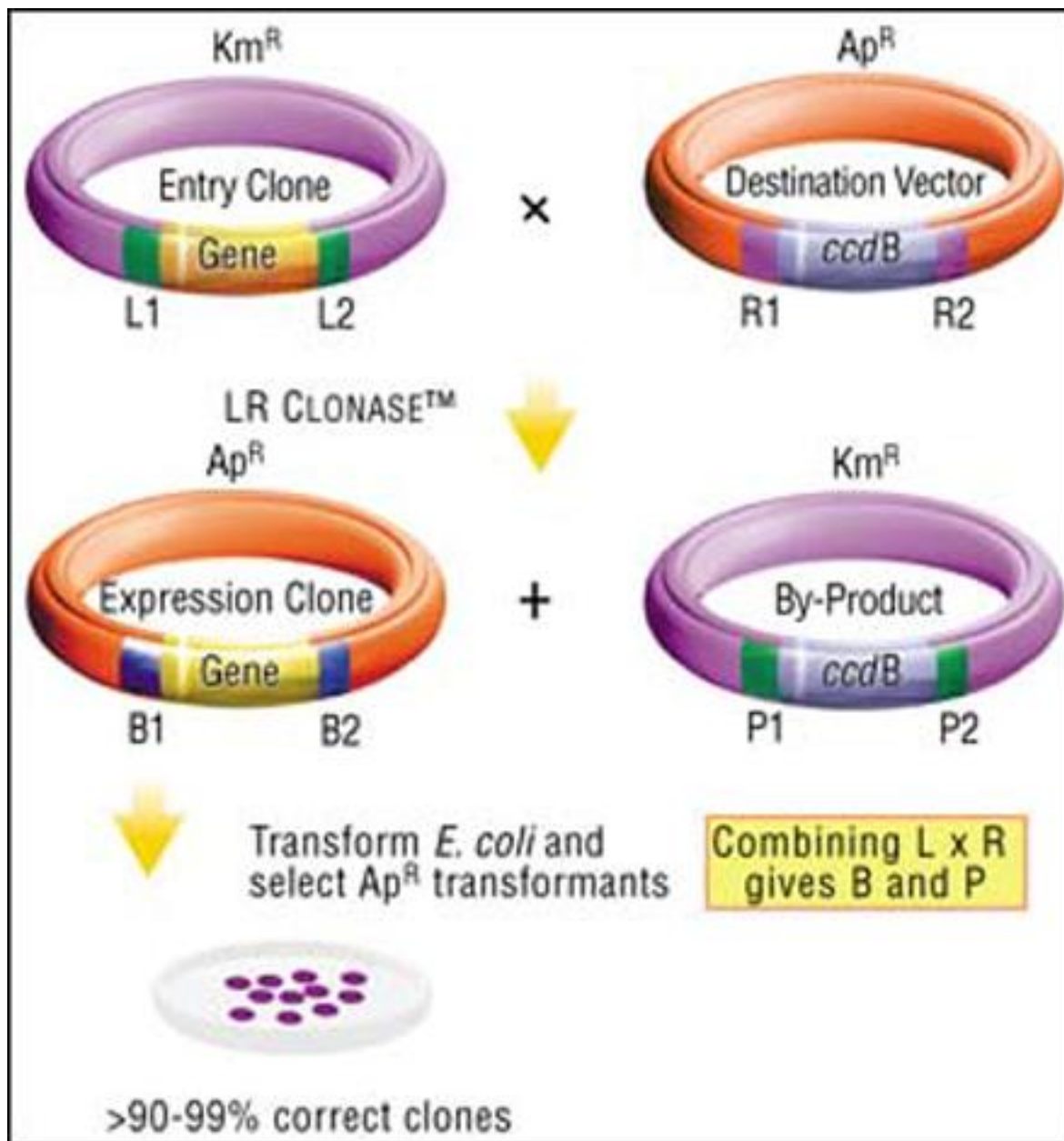
GGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC--N100-----N100--ACCCAGCTTTCTT GTACAAAGTGGTCCCCC

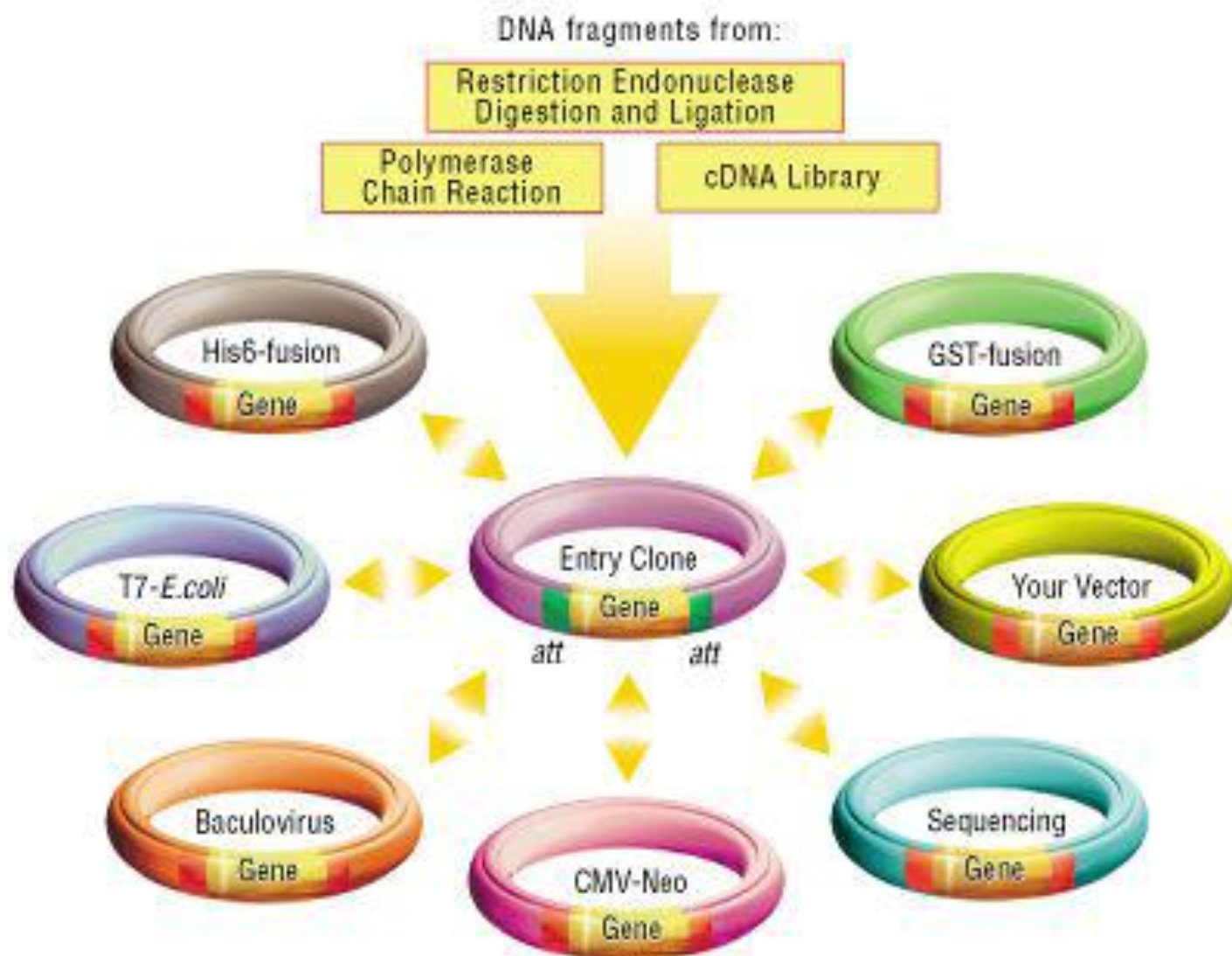
ccdB-CmR

CCCCCTGTTCAAACATGTT TT **TTCGACTTG**-N100-----N100--**TGGGTCGAAAGACATG**TTTCACCAGGGGG

attR1

attR2





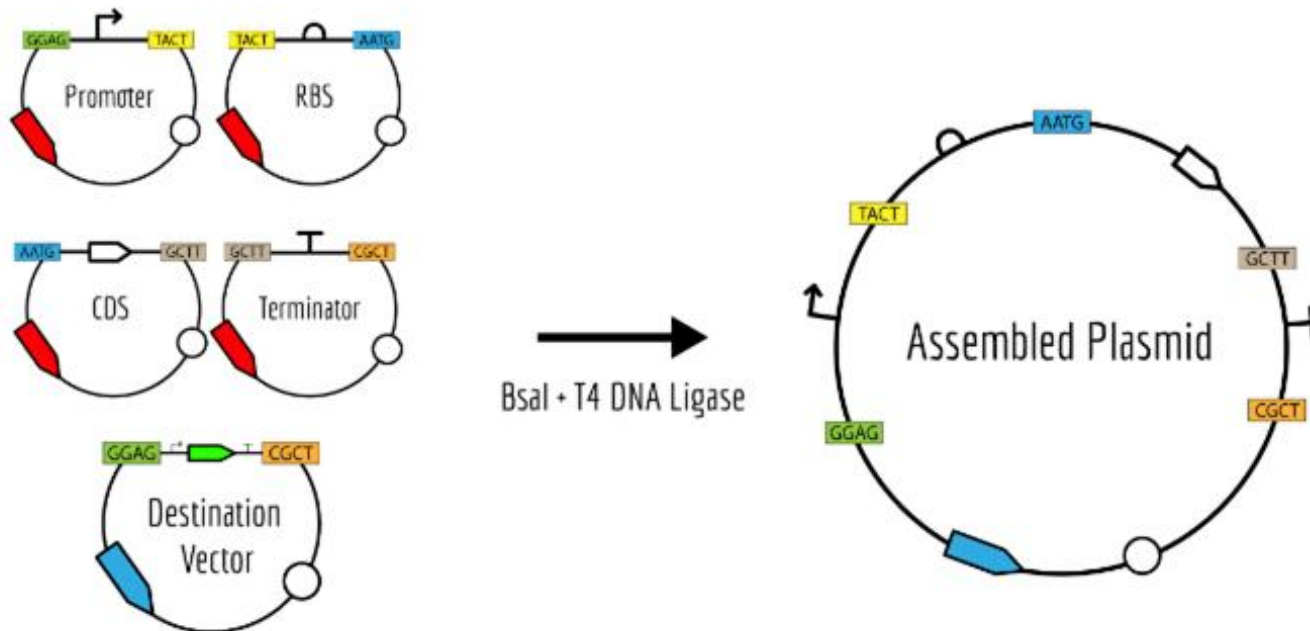
Golden Gate Assembly Method

Golden Gate plasmid assembly exploits the ability of Type IIS restriction enzymes BsaI to cut outside their recognition sites, creating DNA fragments with an overhang of 4 bp

BsaI has a recognition site of GGTCTC(N1/ N5), where the GGTCTC represents the recognition/binding site, and the N1/ N5 indicates the cut site: one base downstream on the top strand, and five bases downstream on the bottom strand.

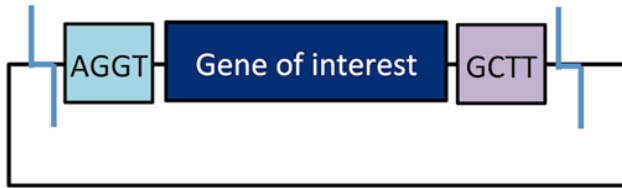
Quindi...

Si possono creare flanking sequences diverse e complementari in modo mirato



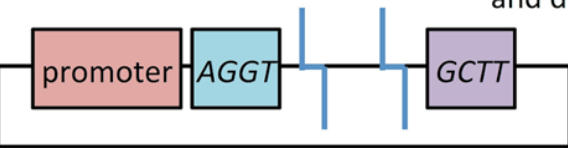
Golden Gate Assembly Method

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



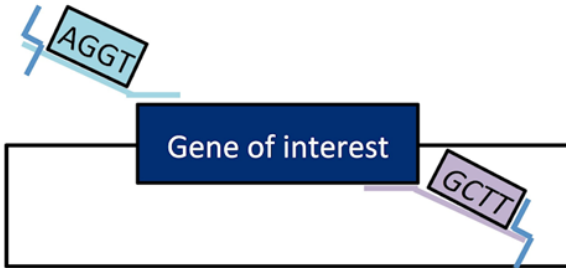
+

Mix with destination vector and digestion/ligation buffer

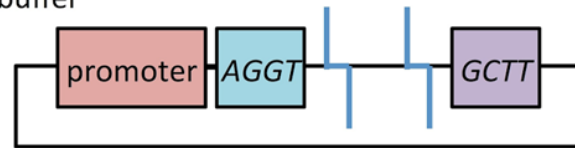


Type IIS restriction sites absent from final product

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



+



Key



Type IIS restriction site (e.g. BbsI)



GCTT 4 base overhang

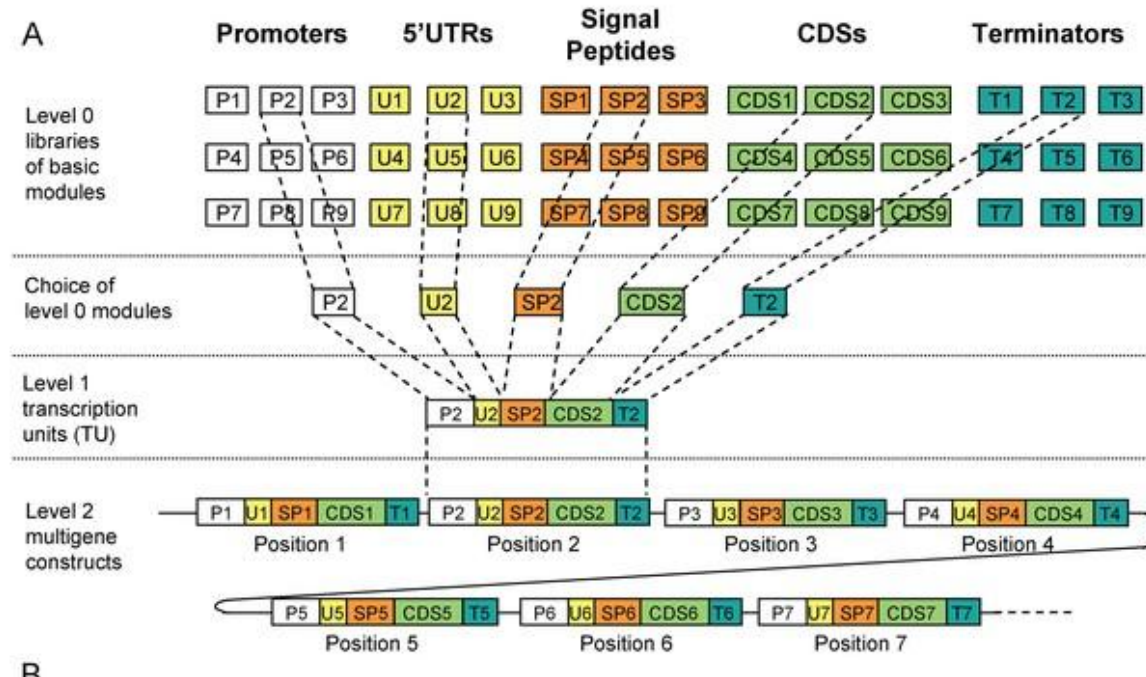


AGGT specifying directionality

Modular Cloning (**MoClo**) is a specific, standardized, and hierarchical application of Golden Gate cloning (using Type IIS enzymes like BsaI) designed **for building complex genetic constructs**.

While Golden Gate is the general technique for one-pot, multi-fragment assembly, MoClo provides a structured, predefined syntax for assembling standardized parts.

all MoClo is Golden Gate, but not all Golden Gate is MoClo



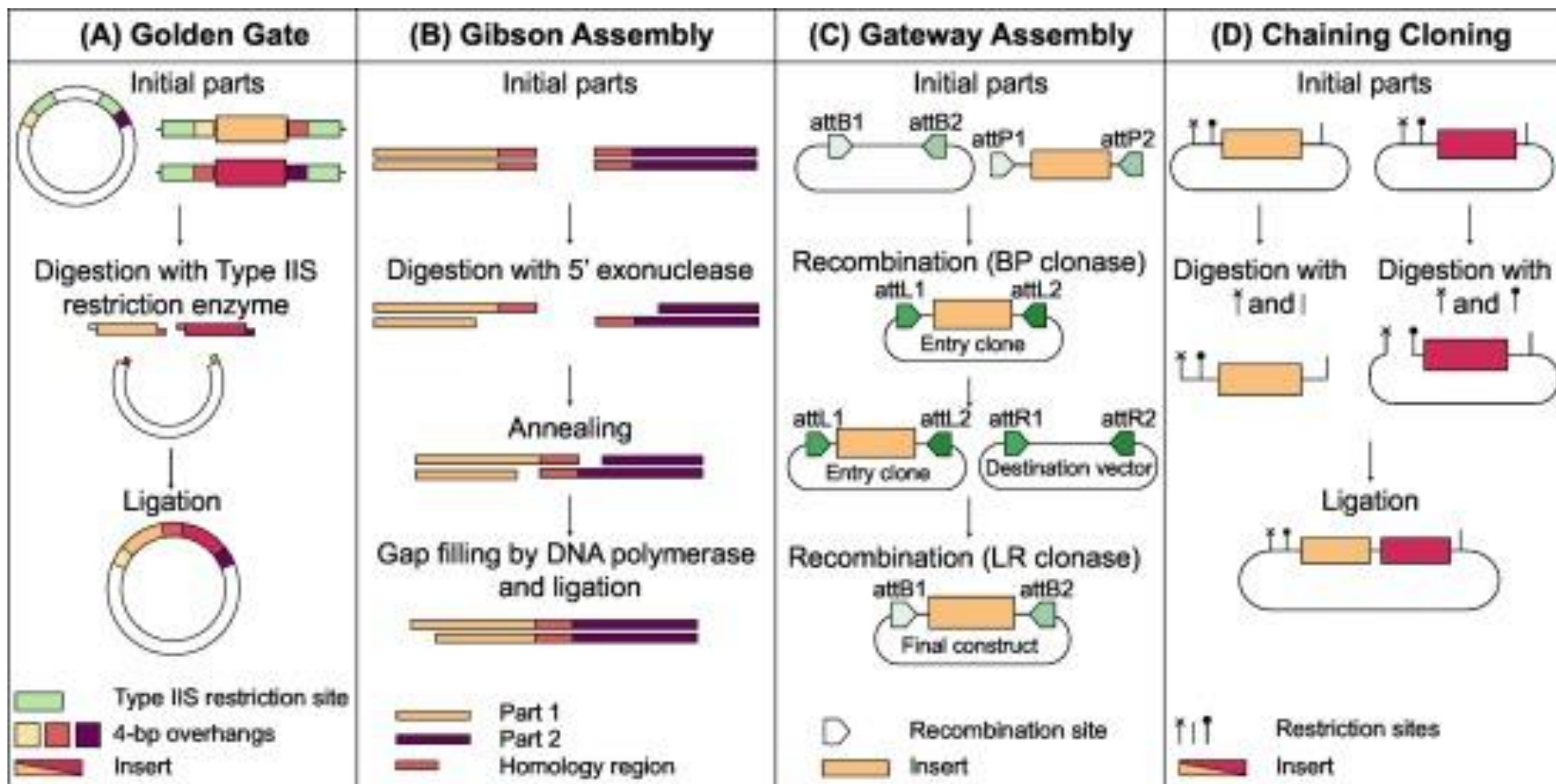
R

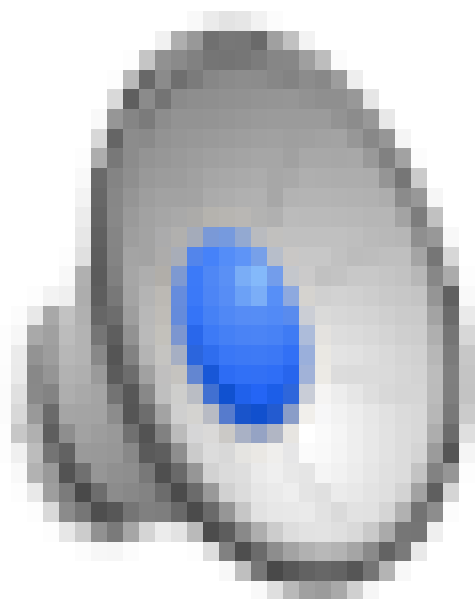
Consists of 3 sets of cloning vectors (Level 0, 1, and 2) which can be used in successive assembly steps. Before beginning, scientists insert fragments of DNA containing basic parts (promoters, UTRs, coding sequences, terminators, etc.) flanked by **unique, standardized sites into individual Level 0 plasmids**.

1st step: compatible Level 0 parts are directionally assembled into a Level 1 vector creating a single transcriptional unit (a promoter, a 5' UTR, a signal peptide or fusion tag, a protein-coding gene, and a terminator).

2nd step: up to 6 Level 1 modules can be assembled into a Level 2 vector, forming a functional genetic circuit.

3rd step: combining multiple Level 2 vectors permits the creation of even more complex constructs constrained only by the ability of *E. coli* to maintain the final plasmid after transformation.





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

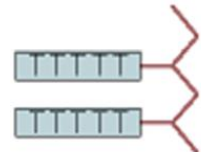
Librerie di cDNA

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

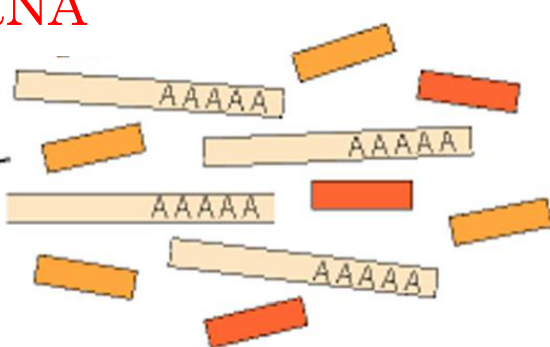
Rappresentano un'istantanea del genoma completo (trascrittoma) di un organismo

Purificazione di mRNA

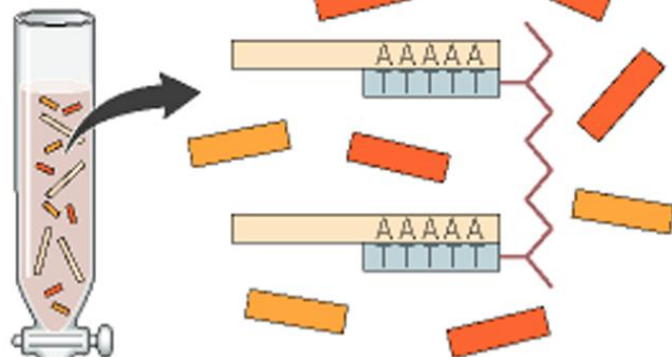
Oligo(dT)
cellulosa



cellulare totale

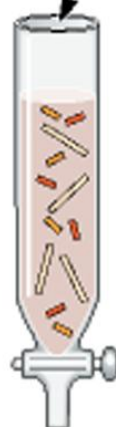


L'mRNA poli(A)
si ibrida
con l'oligo(dT)



100 mM NaCl

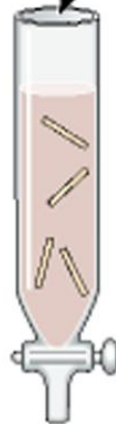
100 mM NaCl



L'rRNA e il tRNA si staccano
e vengono eliminati



10 mM Tris
1 mM EDTA



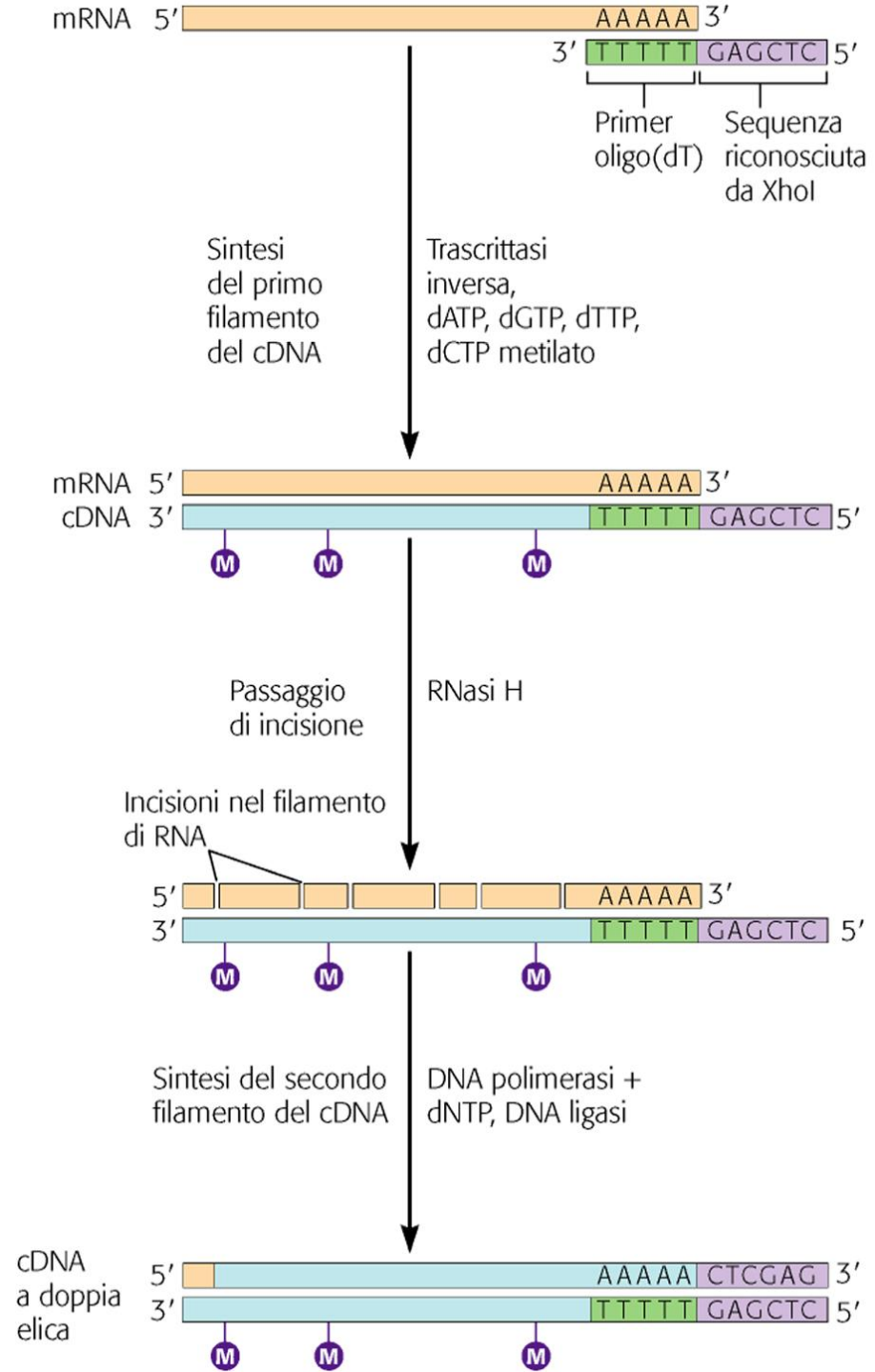
L'mRNA viene eluito



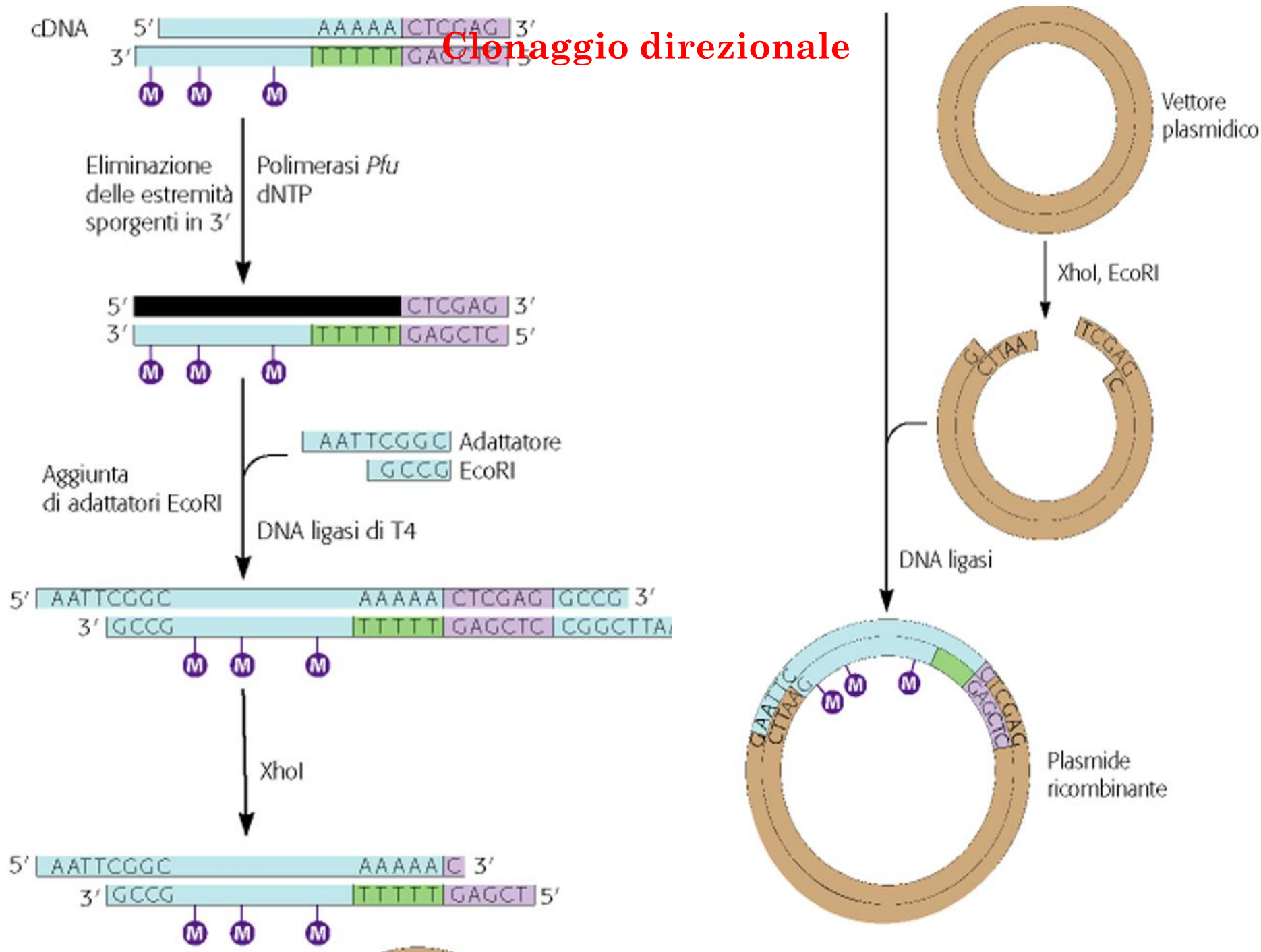
Sintesi di cDNA

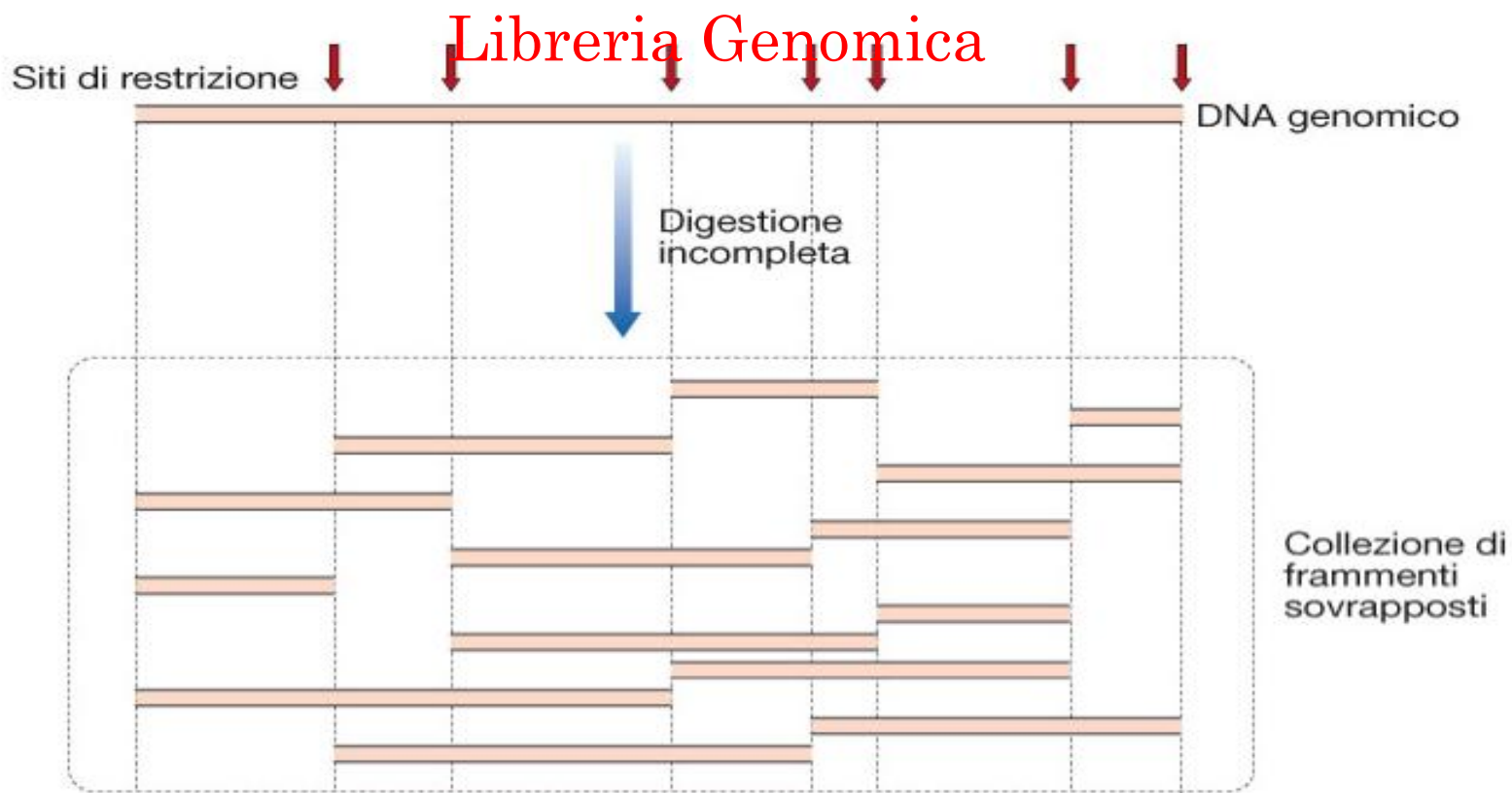
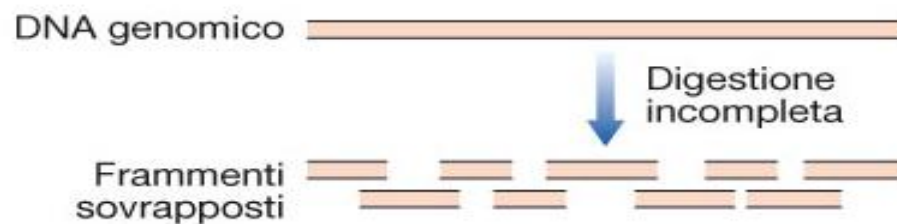
Se il cDNA deve essere impiegato per la costruzione di una libreria, i primer portano un sito di restrizione per il successivo clonaggio (XhoI). Oltre a dATP, dGTP, dTTP, si userà **dCTP metilato** così da produrre un cDNA metilato in cui eventuali siti XhoI non saranno riconosciuti dall'enzima.

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



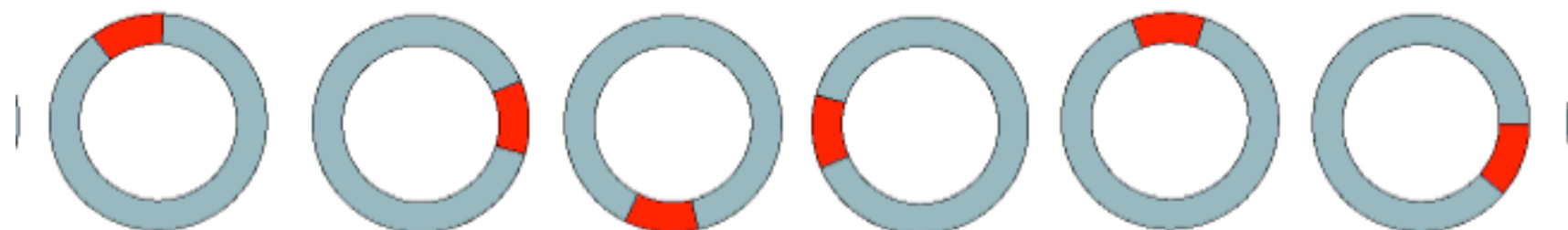
Clonaggio direzionale



A**B**



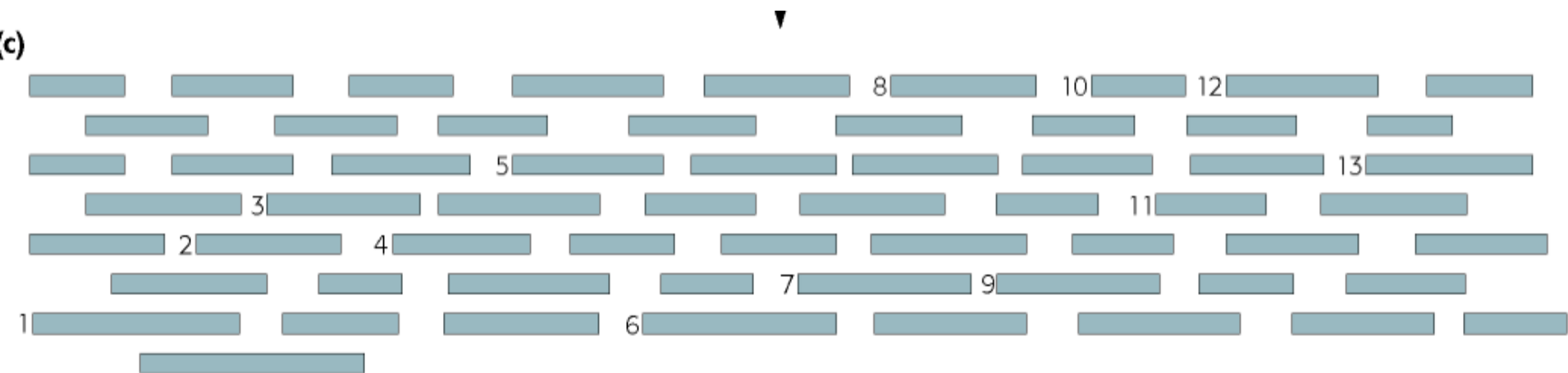
Costruzione di una libreria di cloni
con inserti lunghi che rappresenta
il genoma 10x



Costruzione della mappa di contig

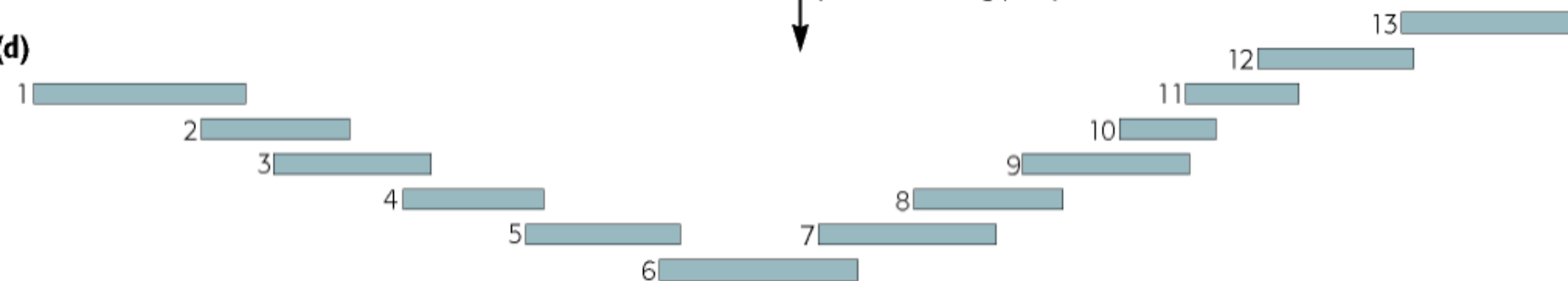


(c)



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'inserito (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	$2,3 \times 10^4$

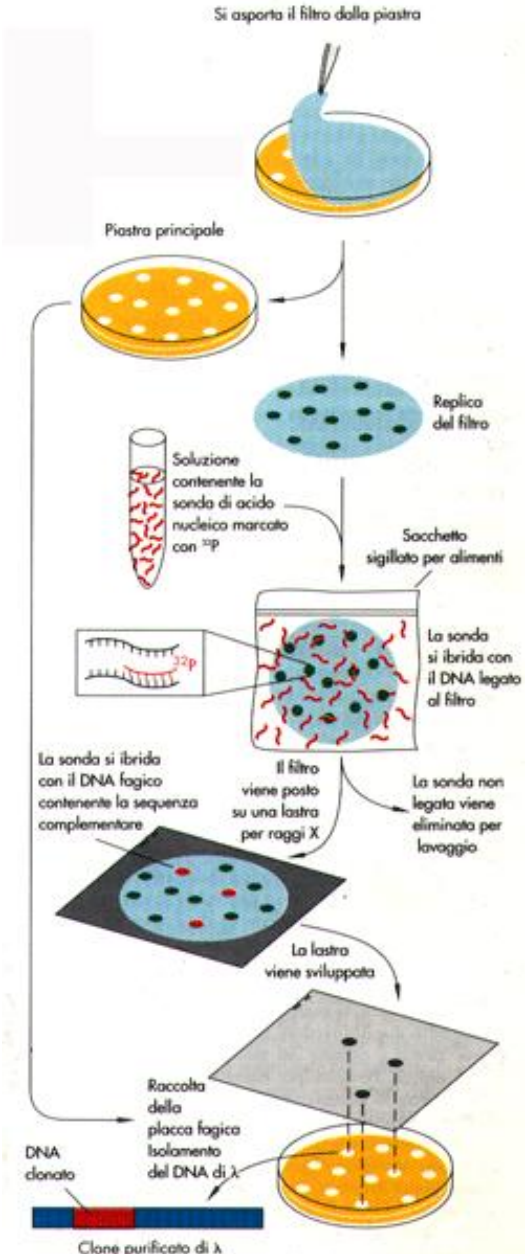
Clonaggio di YFG

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 può 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'

	TGC	ATG	GAC	GAG	ATG	AAG	CGC	AAC	ATC	TT	
AGG	ACG	TAC	CTG	CTT	TAC	TTC	GCA	TTG	TAG	AAA	GAT GAG

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.

