

Biochimica e Biotecnologia molecolare

Tecniche di manipolazione del DNA

- Endonucleasi di restrizione.
- Separazione elettroforetica del DNA.
- Sintesi chimica e sequenziamento del DNA.
 - Tecniche di blotting.
 - Il clonaggio.
- **Reazione a catena della DNA polimerasi (PCR).**
 - Mutagenesi in vivo ed in vitro.

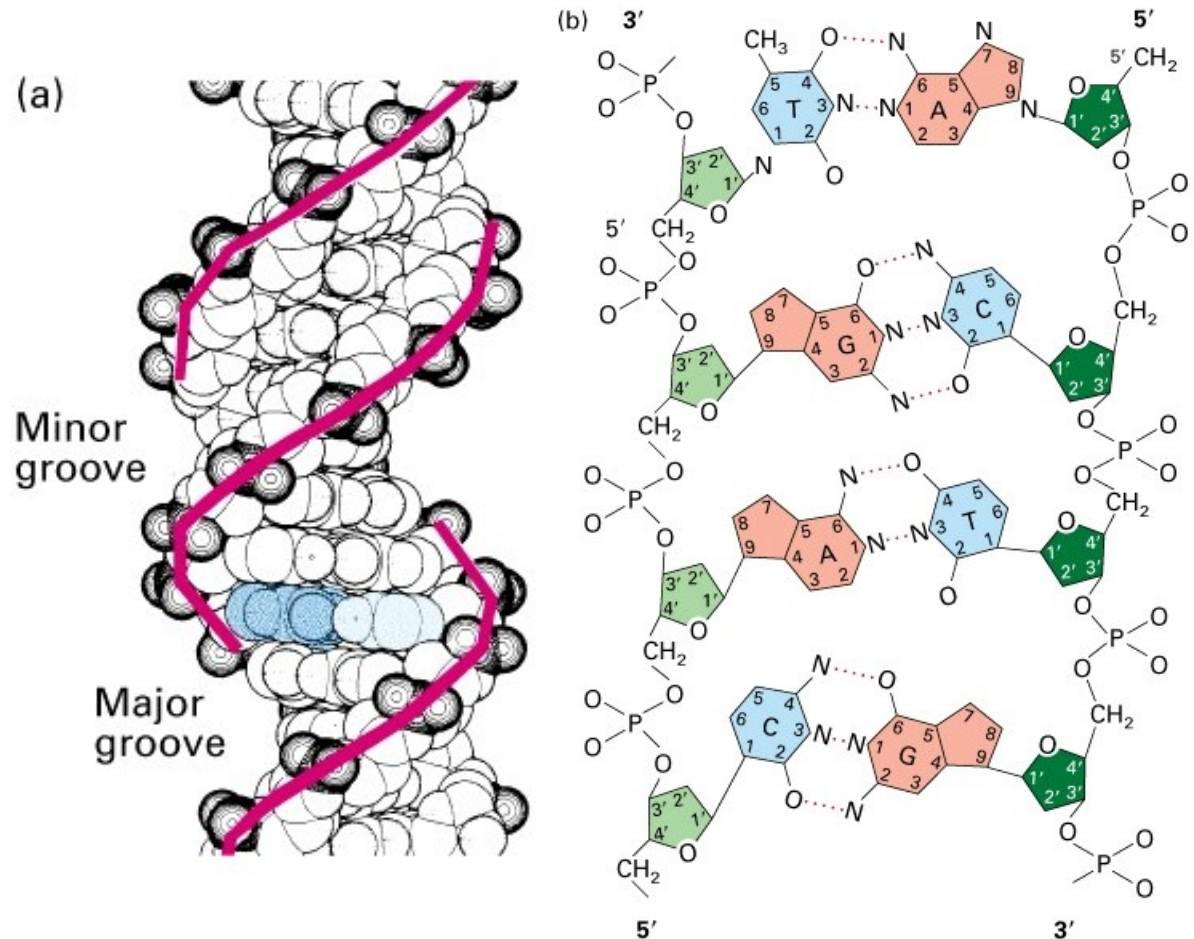
Molecular Genetic Methods

- **Polymerase Chain Reaction (PCR)
(different methods)**
- **DNA sequencing (manual/automated)**
- **DNA Fingerprinting (DNA typing/profiling)**
- **Single nucleotide polymorphisms (SNPs)**

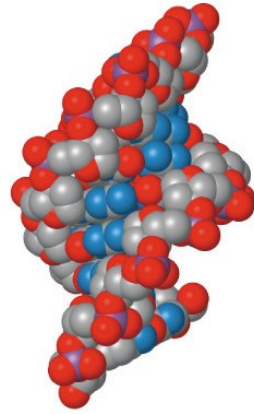
PCR

- **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Native DNA is a double helix of complementary antiparallel chains

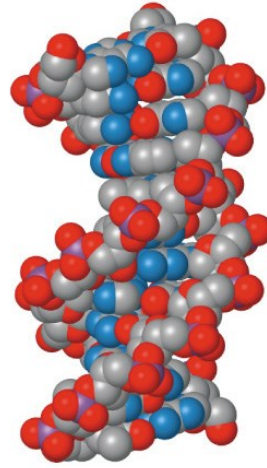


Hydrogen bonding between complementary base pairs (A-T or G-C) holds the two strands together



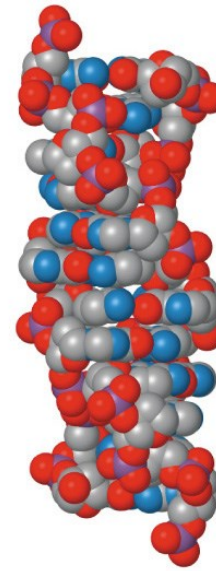
A-DNA

right-handed



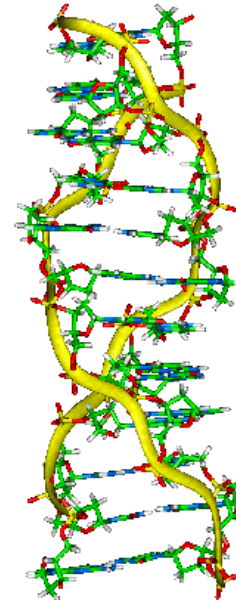
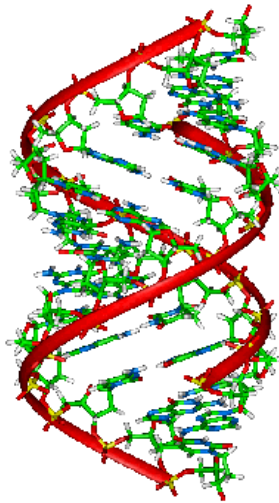
B-DNA

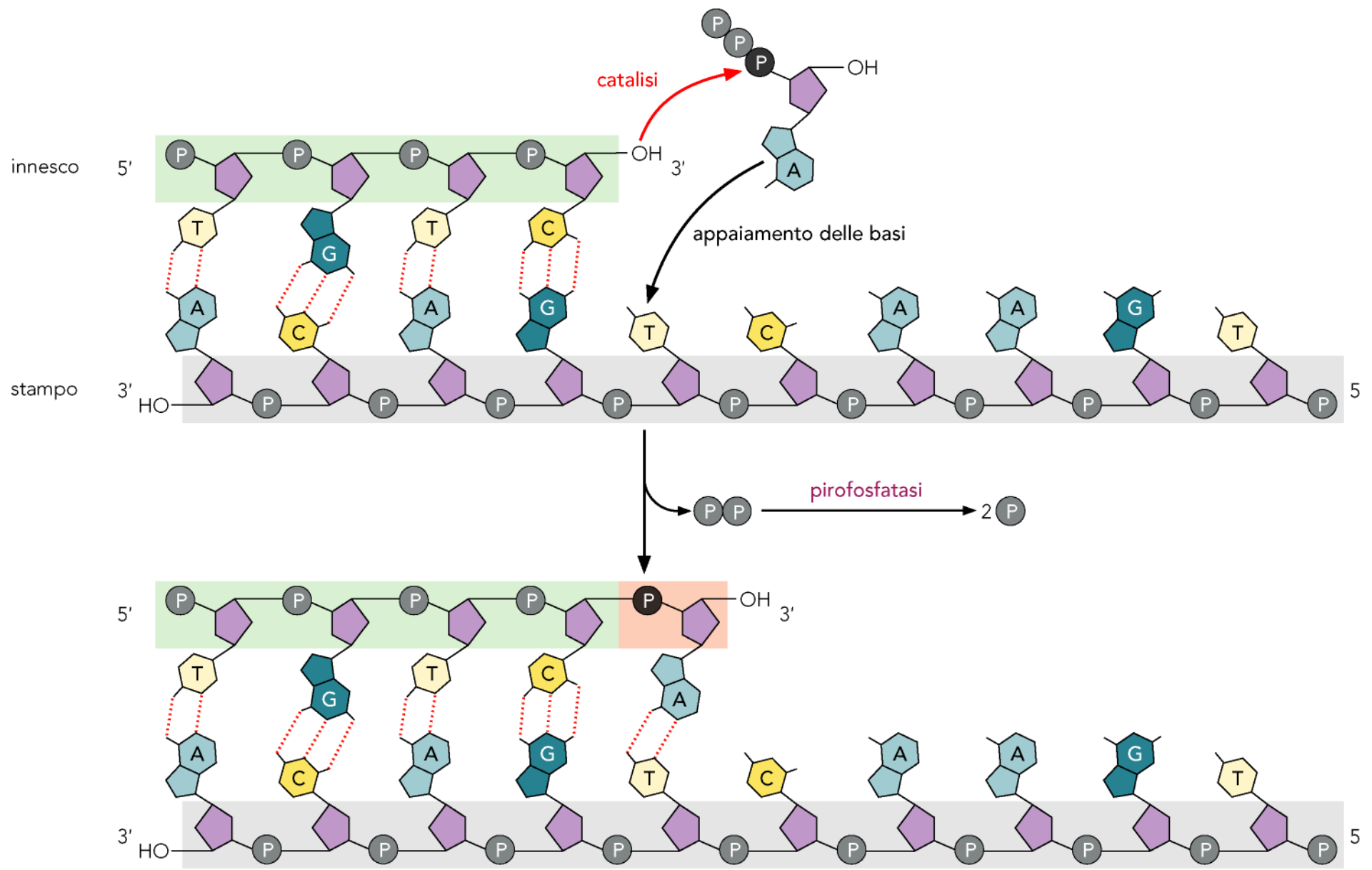
right-handed



Z-DNA

left-handed





Copyright (c) by W. H. Freeman and Company

La DNA polimerasi

- ✓ Attività di sintesi 5' → 3'
- ✓ Attività di esonucleasi 3' → 5' (correzione errori)
- ✓ Attività esonucleasica 5' → 3' rimuove i ribonucleotidi dei frammenti di Okazaki
- ✓ Fedeltà della replicazione:
1 errore / ~ 10⁹ nt copiati
- ✓ Velocità: ~ 1000 nt/sec

Taq Polimerasi

- Le prime reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando il frammento **Klenow della DNA polimerasi I**, erano poco efficienti perché, essendo la Klenow termolabile, doveva essere aggiunta ad ogni ciclo di amplificazione.
- Un significativo **miglioramento** della PCR si deve all'**introduzione della Taq DNA polimerasi**, una DNA polimerasi termostabile, isolata da *Thermus aquaticus*, un batterio termofilo.

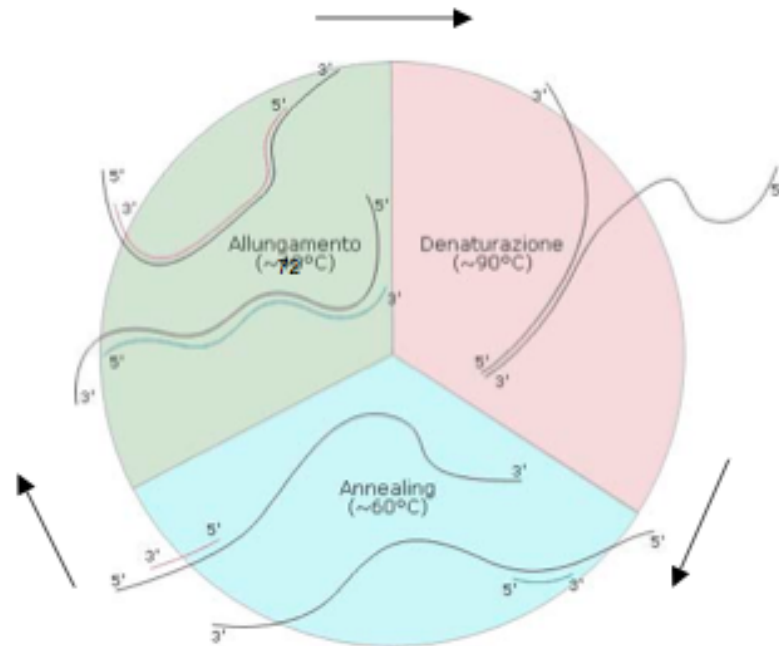
Taq Polimerasi

- La Taq DNA polimerasi ha un optimum di attività a 72°C. L'elevata T a cui avviene la fase di estensione aumenta la specificità della reazione.
- La Taq DNA polimerasi è resistente alle alte temperature, può sopportare la fase di denaturazione a 94-95°C, e ha permesso l'automatizzazione dell'intera procedura, e un deciso miglioramento della specificità della reazione.



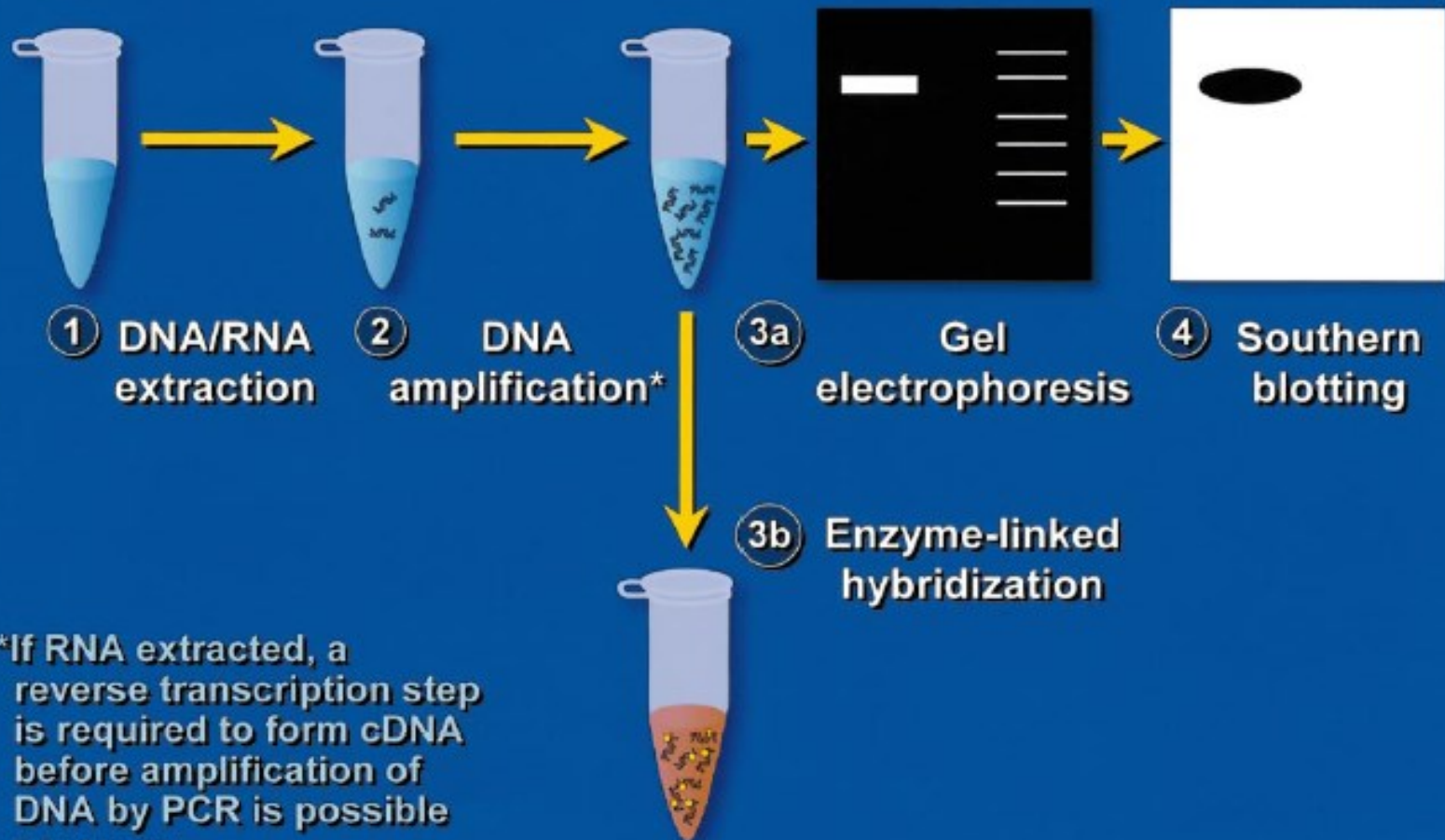
Kary Banks Mullis (nato il 28 dicembre 1944 a Lenoir in North Carolina), biochimico statunitense. Ha ottenuto il dottorato di ricerca a Berkeley nel 1973.

Nobel per la Chimica nel 1993, Kary Mullis è divenuto una leggenda per la scoperta della PCR (Polymerase Chain Reaction) una tecnica che ha rivoluzionato il mondo della chimica e della genetica, permettendo l'amplificazione in vitro di frammenti di DNA (il cosiddetto "test del DNA"), con innumerevoli applicazioni in campo medico, agrario, animale e nelle investigazioni della magistratura.



<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis-autobio.html>
Mullis, K.B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction.
Scientific American. 262 (4) 56-65.

Conventional PCR-Based Testing Formats



CP1049330-1

Cockerill FR III. Arch Pathol Lab Med. 2003;127:1112 ([www](#))

Copyright (c) by W. H. Freeman and Company

PCR Cycle

DENATURATION
93°C - 95°C

ANNEALING
37°C - 65°C

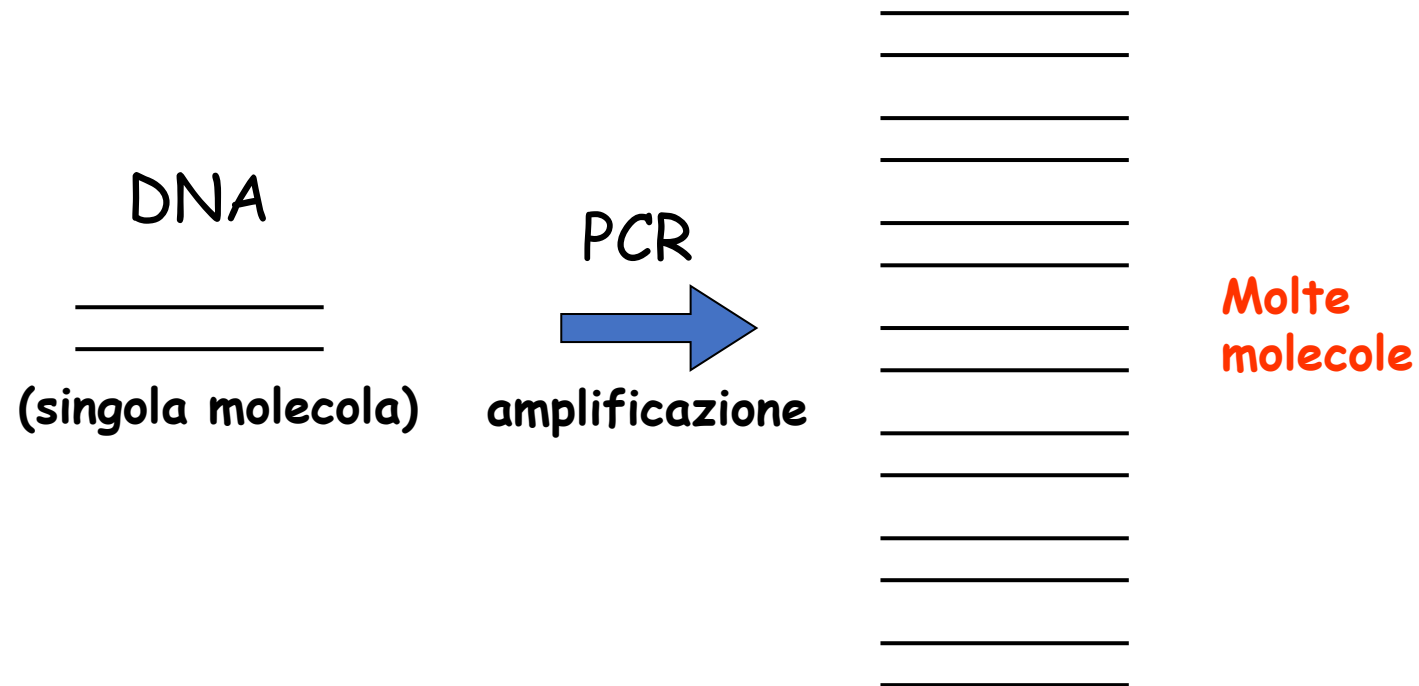
25-35 CYCLES

DENATURATION
93°C - 95°C

EXTENSION
72°C

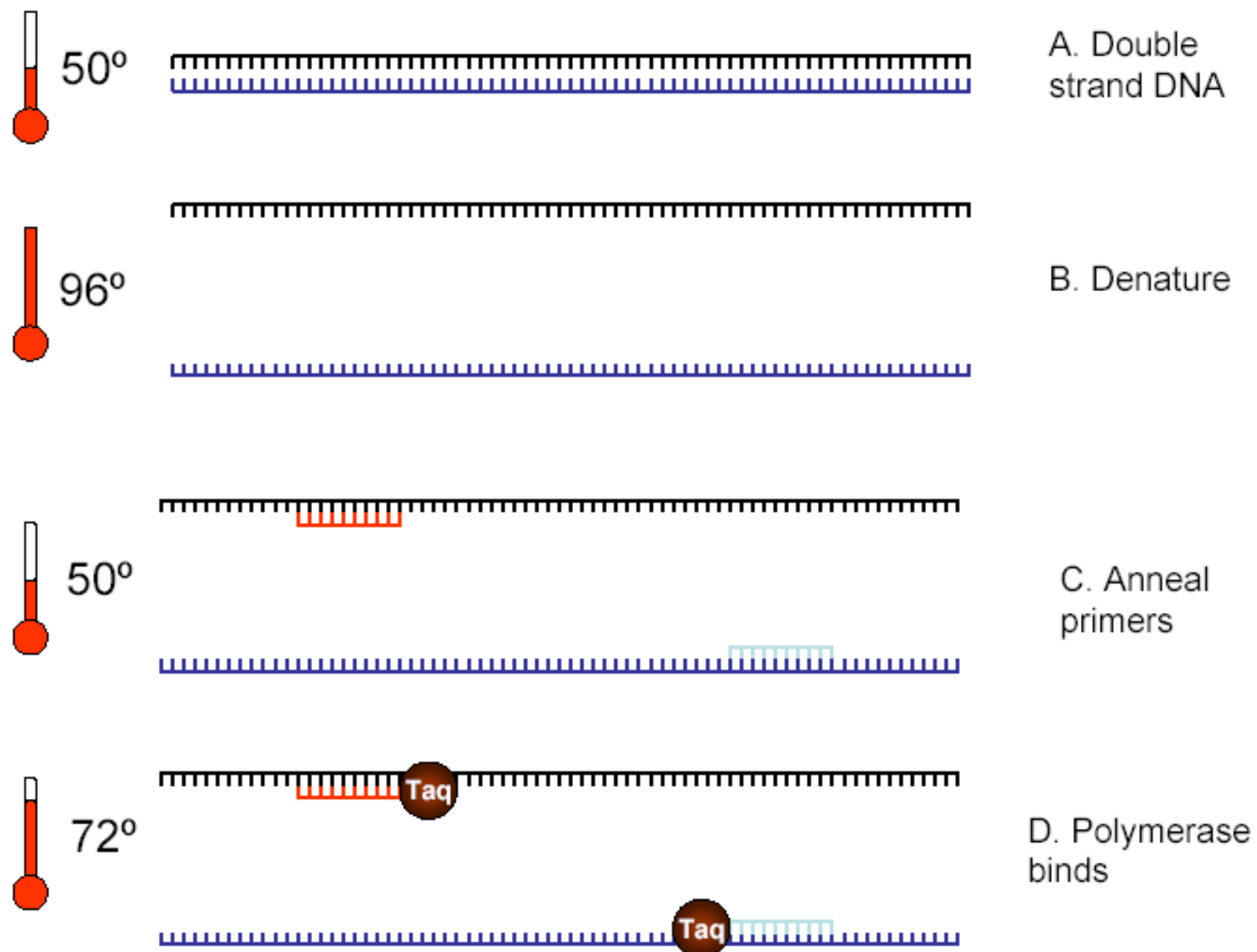
Polymerase Chain Reaction - PCR

La PCR: rivoluzione nelle tecniche di manipolazione del DNA
E' una tecnica di amplificazione del DNA



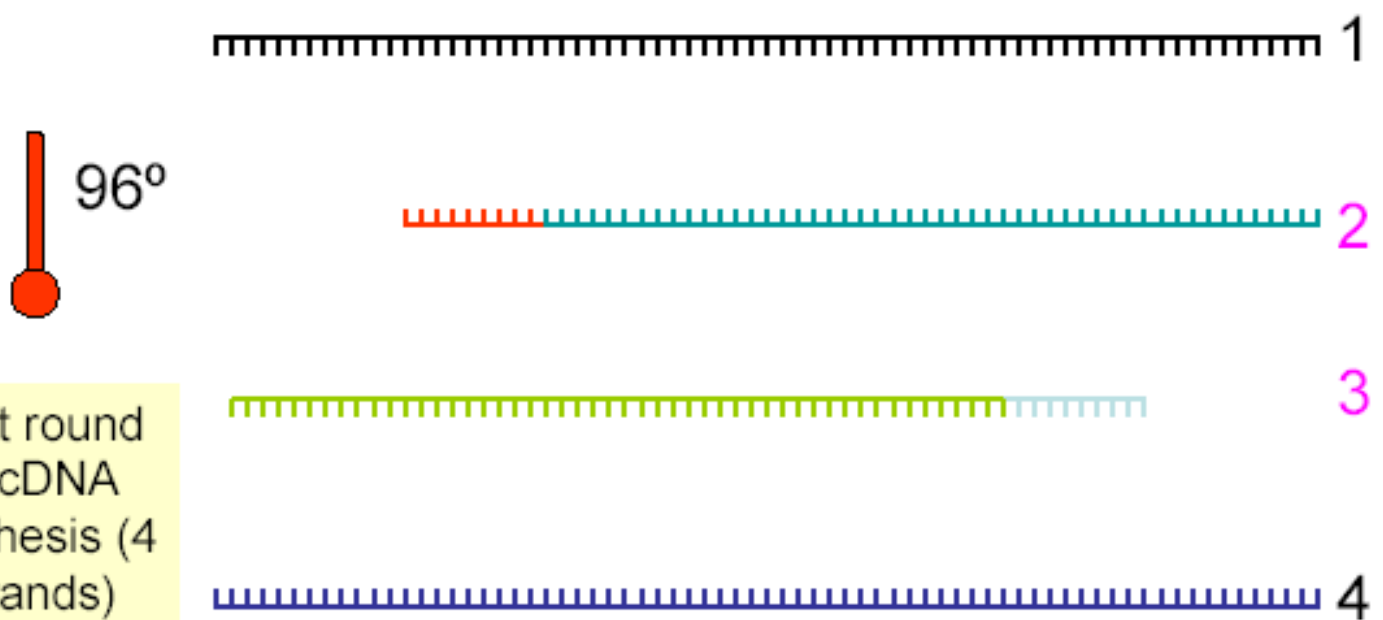
Dopo la **PCR**

CLONAZIONE
MOLECOLARE
SENZA CELLULE



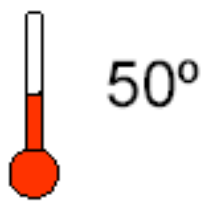


E. Copy strands



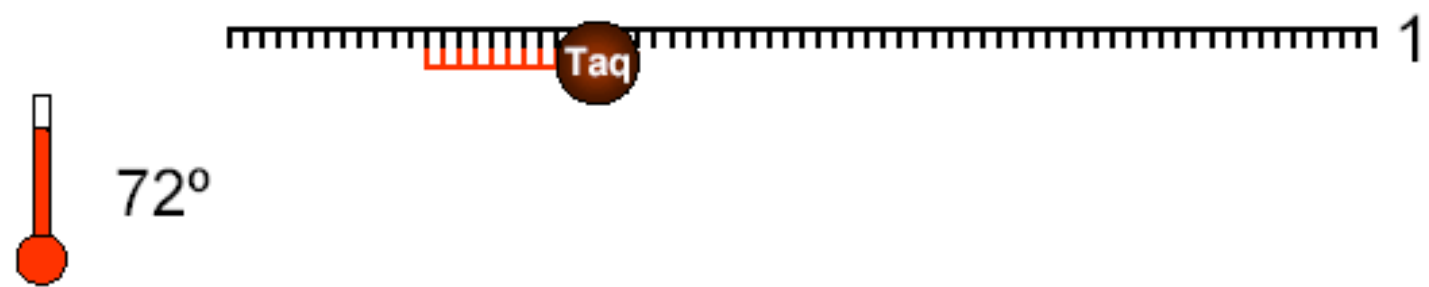
F. Denature

First round
of cDNA
synthesis (4
strands)



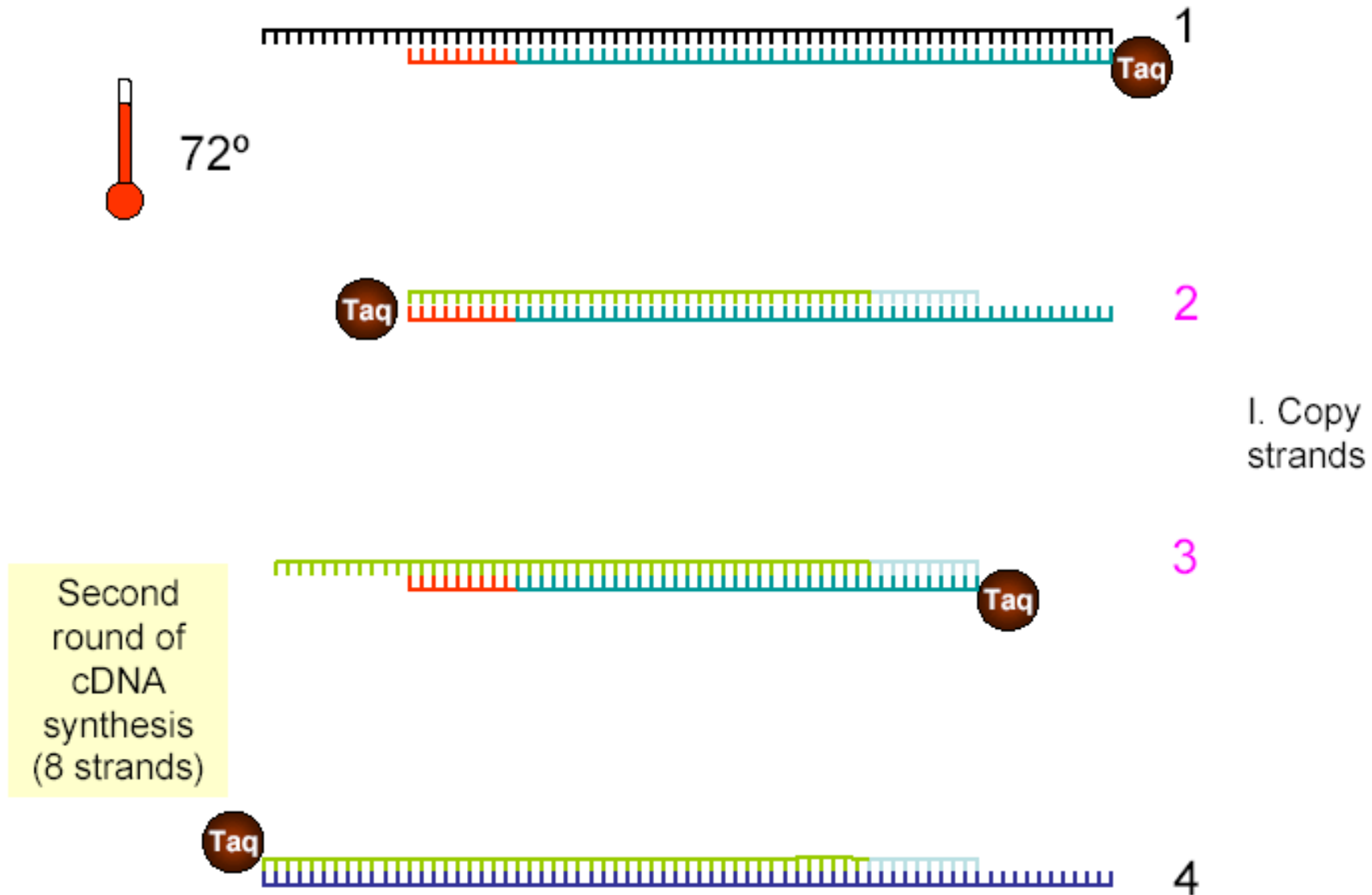
G. Anneal primers



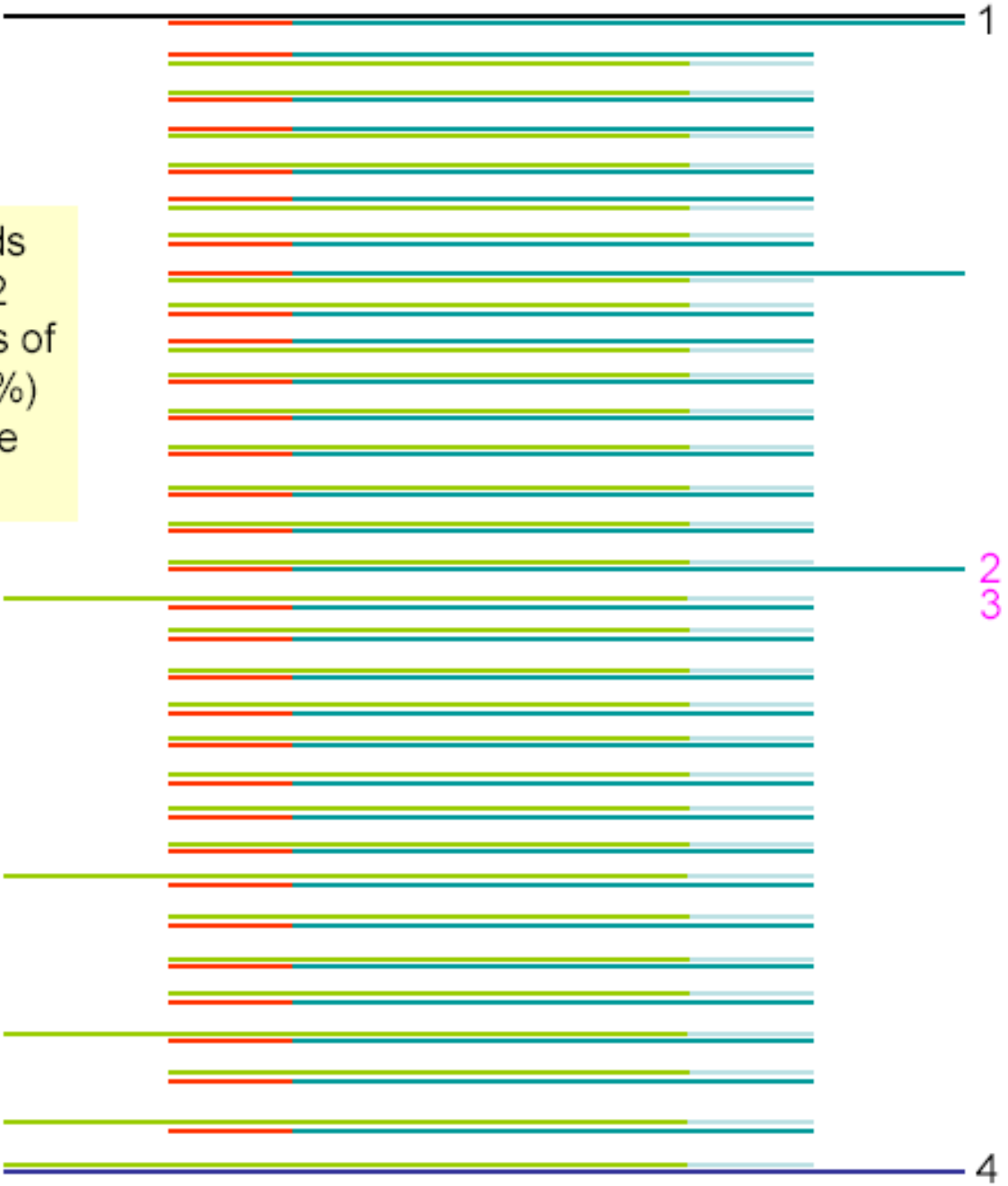


H.
Polymerase
binds





After 5 rounds
there are 32
double strands of
which 24 (75%)
are same
size



PCR technique (Polymerase Chain Reaction)

Prodotto ottenuto da 1 molecola di stampo

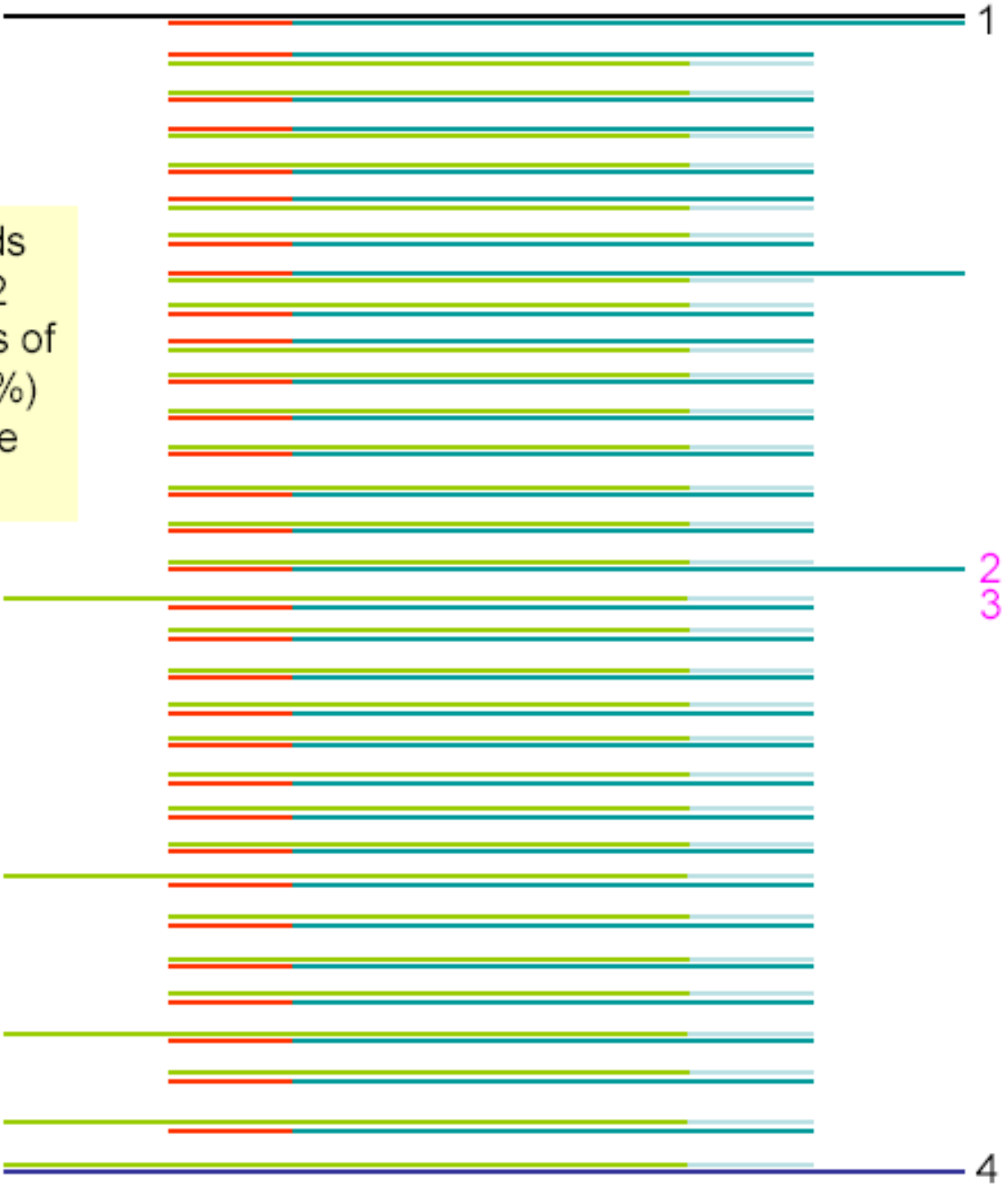
= (quantità di stampo) $\times 2$ (numero di cicli)

= (1) $\times 2^{35} = 3.4 \times 10^{10}$ molecole

34,000,000,000

TB

After 5 rounds
there are 32
double strands of
which 24 (75%)
are same
size



PCR technique (Polymerase Chain Reaction)

Prodotto ottenuto da 1 molecola di stampo

= (quantità di stampo) $\times 2$ (numero di cicli)

= (1) $\times 2^{35} = 3.4 \times 10^{10}$ molecole

34,000,000,000

TB

PCR e Clonaggio

PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

PCR + Recombinant DNA

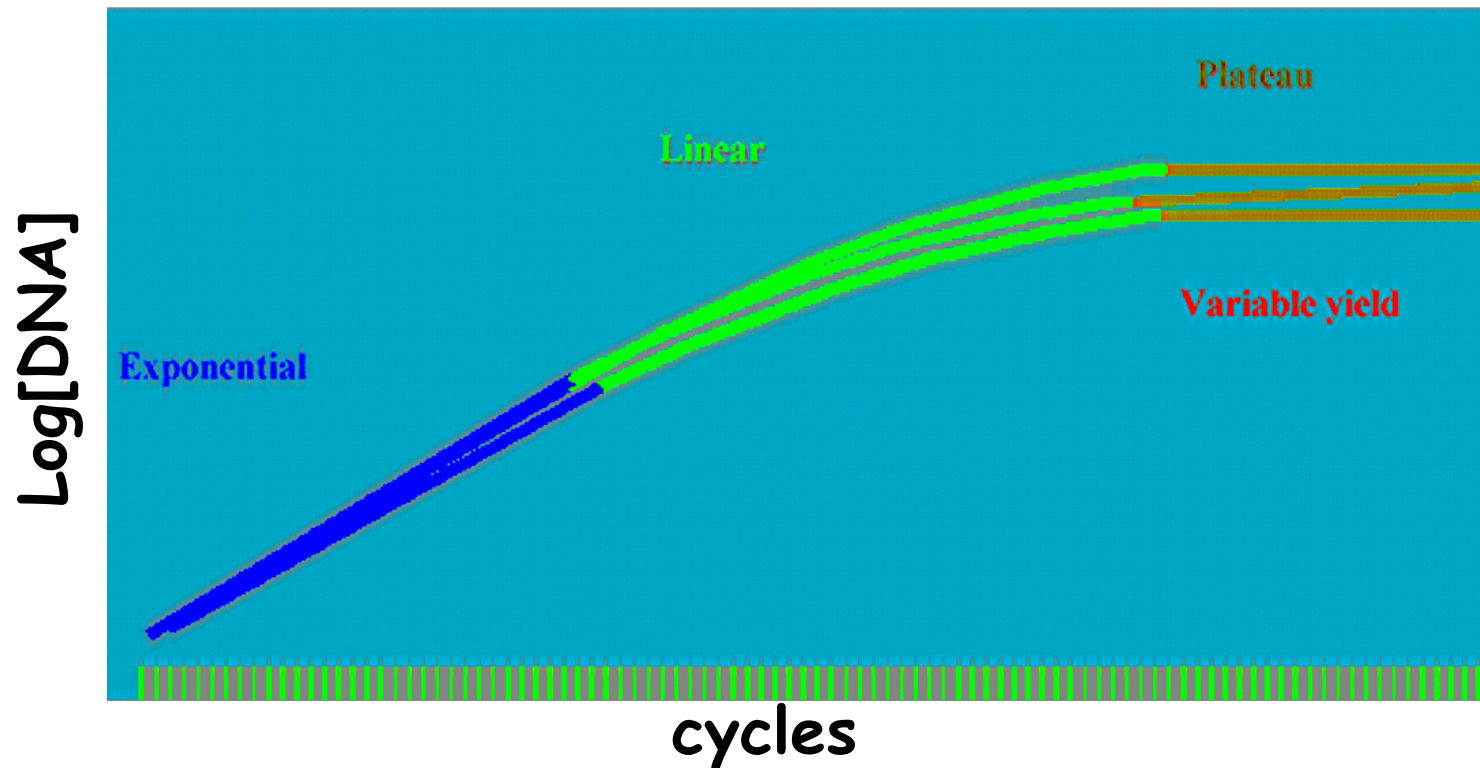
<https://www.youtube.com/watch?v=kSOoFQue0Ag>

Resa teorica

$$P = (2)^n T$$

Il prodotto (P) incrementa esponenzialmente
con il numero di cicli di PCR (n)

Il prodotto di PCR dipende da T , numero di copie di
template di partenza



CAUSE DELL'EFFETTO PLATEAU

Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

- ✓ Competizione tra il prodotto dei cicli precedenti e i primers per l'ibridazione
- ✓ Inattivazione termica dell'enzima
- ✓ Riduzione del rapporto molare tra le concentrazioni della DNA-polimerasi e del DNA
- ✓ Riduzione progressiva dell'efficienza di denaturazione e/o di ibridazione
- ✓ Distruzione degli amplificati per l'attività esonucleasica 5'→3' della polimerasi
- ✓ Accumulo di pirofosfati (inibitori della polimerasi)
- ✓ Progressiva diminuzione della concentrazione di uno o più componenti necessari alla reazione (?)

PRINCIPALI FATTORI CHE INFLUENZANO LA RESA DELLA PCR

Specificità	Scelta dei primers Condizioni di reazione Contaminazione
Sensibilità	Scelta dei primers Eterogeneità genomica Presenza di inibitori Tipo di campione Efficienza della reazione
Riproducibilità	Standardizzazione delle fasi del metodo: <ul style="list-style-type: none">➤ preparazione del campione➤ protocollo di PCR➤ sistema di rivelazione

PCR: PARAMETRI DI OTTIMIZZAZIONE

- ✓ Acido Nucleico TARGET
- ✓ Disegno dei Primers
- ✓ Temperatura di Annealing
- ✓ Concentrazione di Mg^{++}
- ✓ Concentrazione di dNTPs
- ✓ Qualità e quantità di Enzima
- ✓ Forza Ionica del tampone
- ✓ Presenza di Cosolventi
- ✓ Parametri dei Cicli
- ✓ Numero di Cicli

Sviluppo e Selezione dei Ceppi

- Mutazioni
- Ricombinazione Genica

Eventi correlati: aumento della produzione di antibiotici con la selezione di mutanti opportuni

I primi ceppi utilizzati

Table 3.1 Increase in antibiotic production through mutation and selection between 1943–1961

Antibiotic	Productivity at time of discovery units/ml	Productivity of high yield mutants units/ml
Penicillin	20 (1943)	8000 (1955)
Streptomycin	50 (1945)	5000 (1955)
Erythromycin	100 (1955)	2000 (1961)
Chlortetracycline	200 (1948)	4000 (1959)
Oxytetracycline	400 (1950)	6000 (1959)

(Alikhanian, 1962)

Directed Mutagenesis and Protein Engineering

- Sometimes the naturally occurring protein simply is not well suited for industrial purposes
- Modifications previously done by random mutagenesis (tedious, limited success at times)
- Now done by directed mutagenesis

Recombinant DNA Technology

- Site directed mutagenesis
 - Base pair substitution
 - Insertion
 - Deletion
 - Plasmid or PCR based approach

MUTAGENESIS OF CLONED GENE

- **Site-directed mutagenesis**
- Changing one or a few nucleotides at a particular site usually involves annealing a mutagenic primer to a template followed by complementary strand synthesis by a DNA polymerase.
- Formerly. Single-stranded templates prepared using M13 were used,

→ but polymerase chain reaction(PCR) techniques are now preferred.

Site-directed mutagenesis

Site directed mutagenesis (SDM) is a powerful technique where site **specific changes in DNA sequence are produced *in vitro***

- For instance, to change an amino acid residue into another by changing the codon sequence within the gene sequence.

PCR-based mutagenesis could be used to achieve two types of changes:

- 5' adds-on mutagenesis which adds specific sequences at the 5' of the amplified product. Such sequences may include a phage promoter to drive gene expression.
- Site-directed mutagenesis which results in an amplified product with a specific base substitution to introduce a specific amino acid substitution at the protein level.

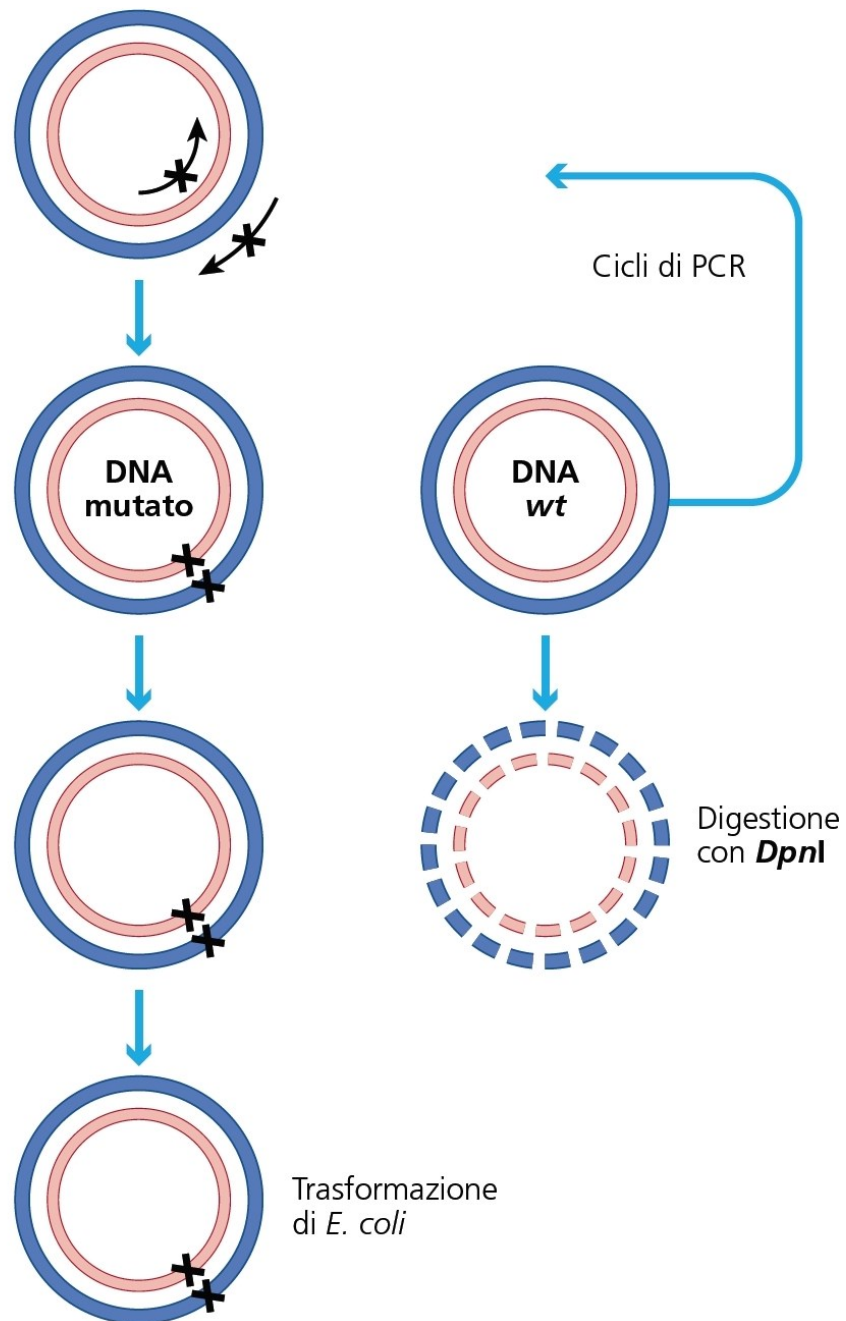
PCR mutagenesis

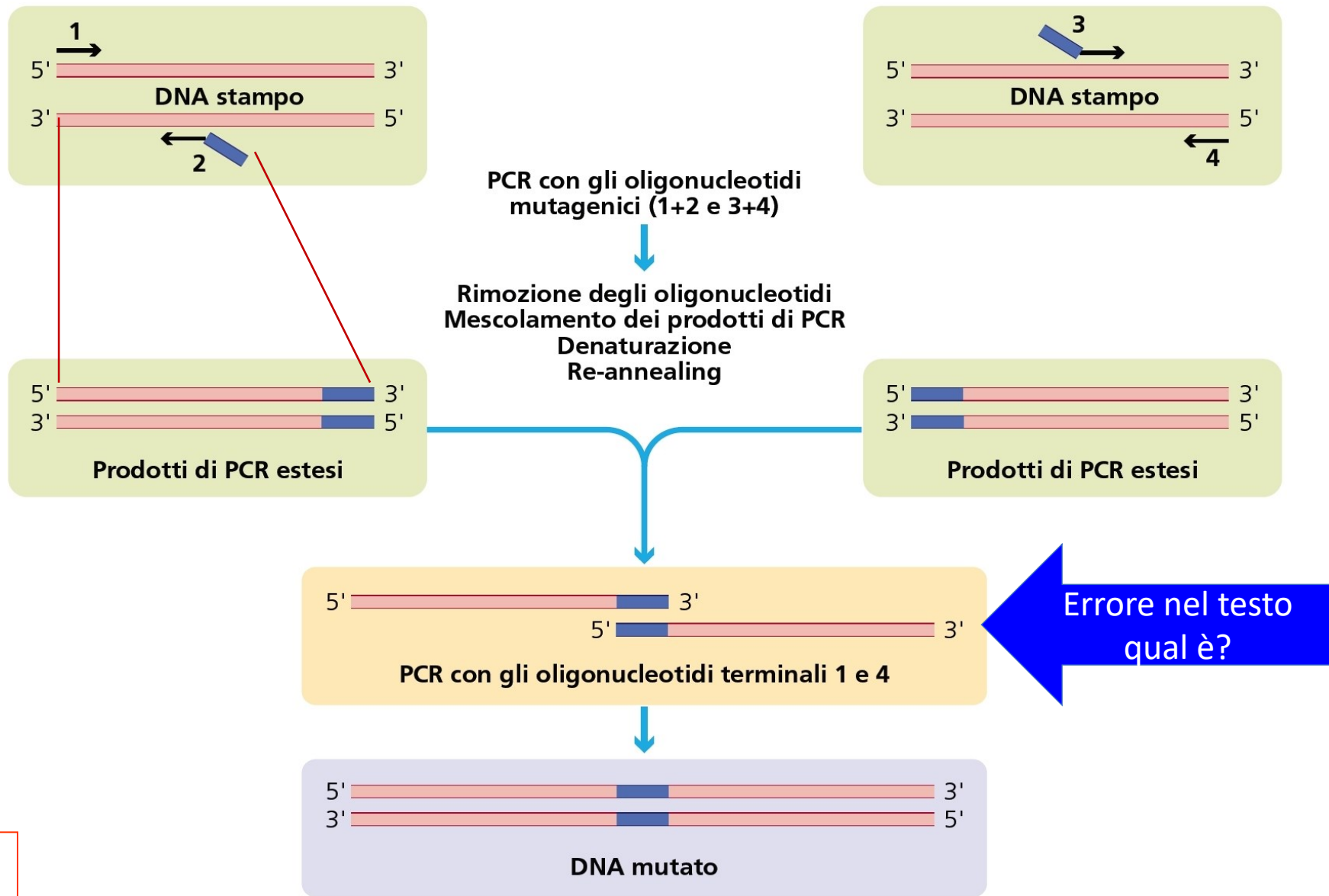
- Used to produce either **deletion** or **point mutations**.
- A pair of oligonucleotide primers are used to amplify the sequence in order to introduce the mutation into the DNA products

DNA polimerasi	Fonte biologica	Attività endonucleasica 5' > 3'	Attività endonucleasica 3' > 5'	Emivita a 95 °C (min)	Nome commerciale	Velocità di estensione (nucleotidi/s)	Frequenza di errore	Tempo (s) necessario per amplificare 1 kb a 72 °C
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	+	-	40	Ampli <i>Taq</i> , Ampli <i>Taq</i> Gold	75	$1/2 \times 10^5$	32
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	-	+	120	<i>Pfu</i> Turbo	60	$1/2 \times 10^6$	60 -120

Figura 3.12
Schema della procedura di mutagenesi sito-specifica QuikChange® descritta nel testo.

DpnI digerisce il DNA metilato
in corrispondenza della guanina 5'mGATC-3'
l'enzima degraderà solo il wildtype e non il neopolimerizzato per PCR



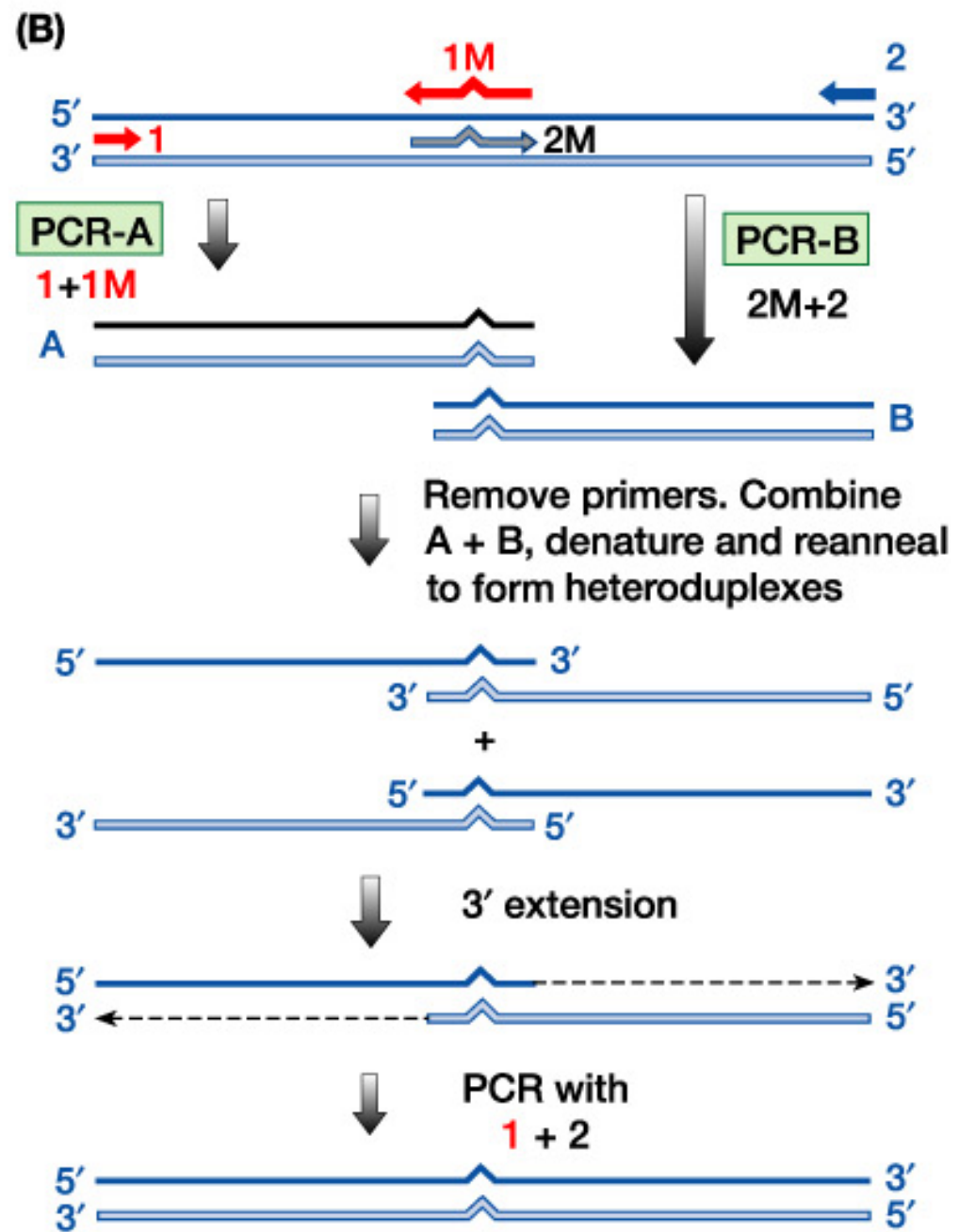
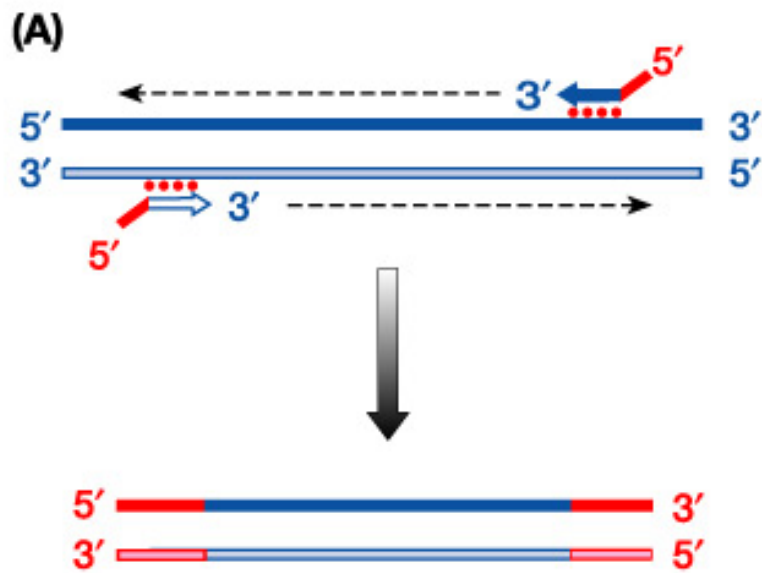


(1)

Figura 3.13

Overlap-Extension PCR. I dettagli sono descritti nel testo.

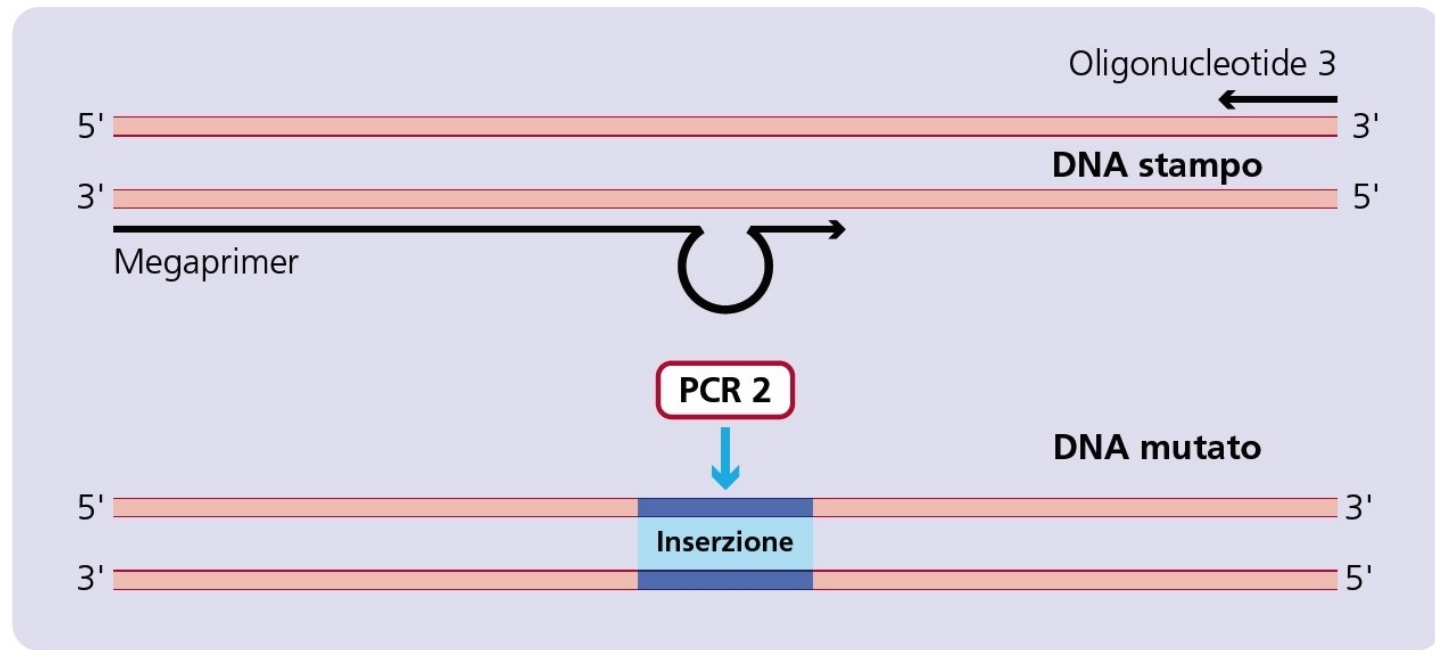
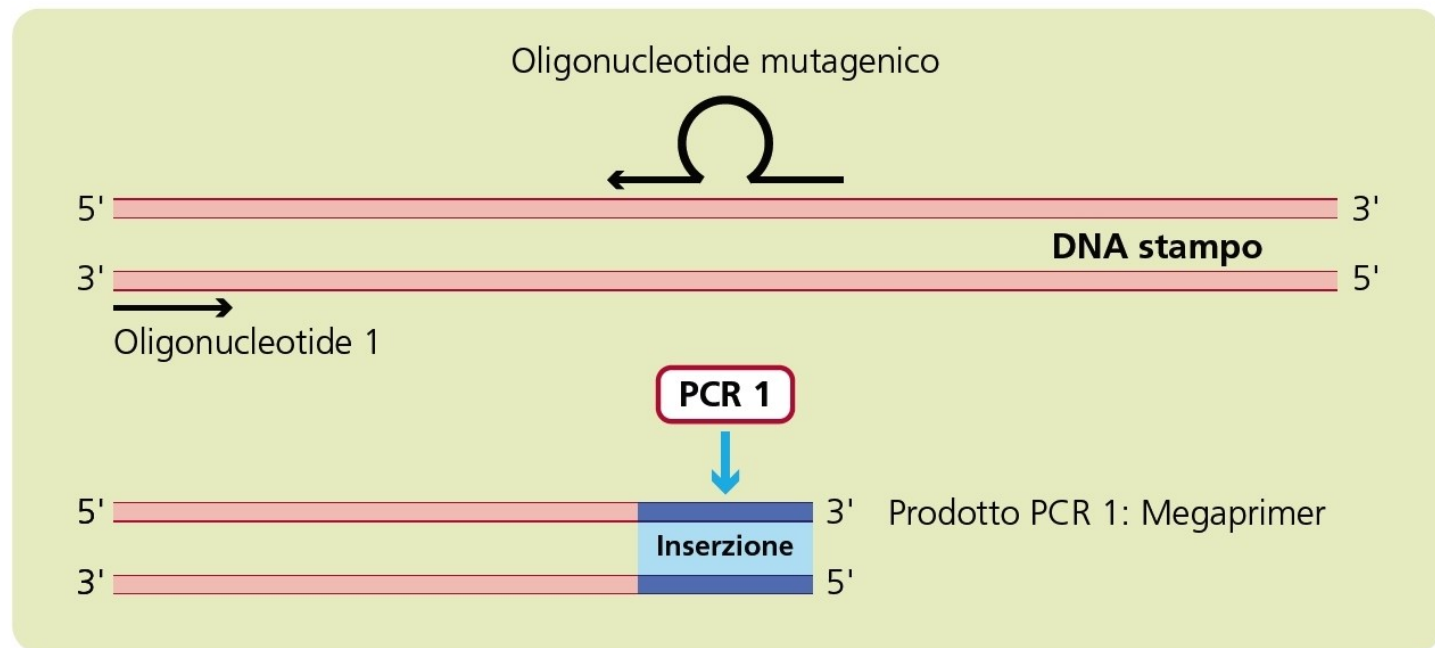
05.



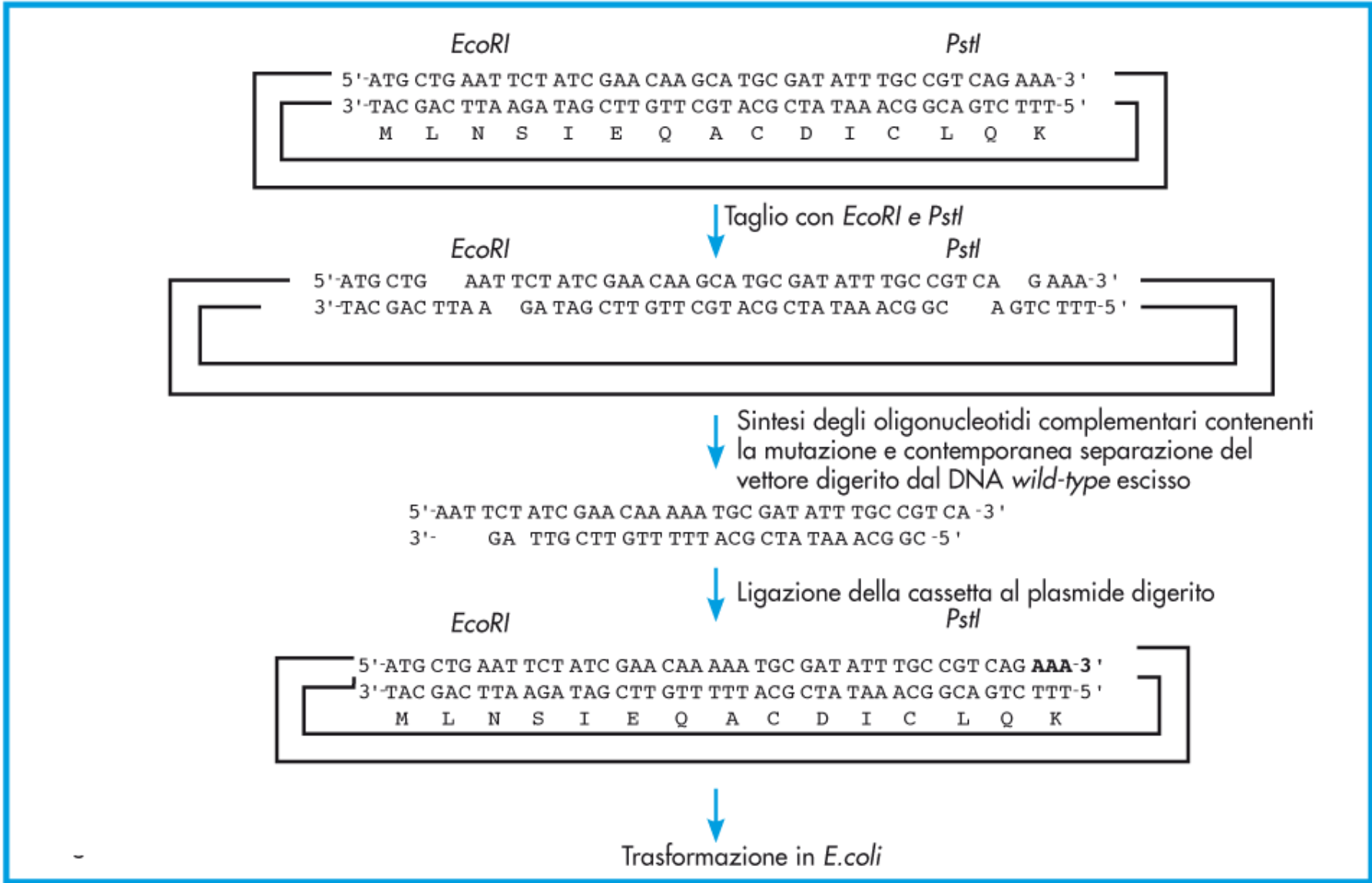
(II)

Figure 5-20 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

Figura 3.14
PCR con il *megaprimer*. I dettagli sono descritti nel testo.



(II)



PCR variation

amplify unknown DNA

- Rapid amplification of cDNA ends (RACE)
 - is a variation of RT-PCR that amplifies unknown cDNA sequences corresponding to the 3'- or 5'-end of the RNA.

Two general 3' or 5' RACE strategies exist:

- 5' cDNA ends (5' RACE) or 3' cDNA end sequences (3' RACE).
- In either strategy:
 - the first step involves the conversion of RNA to single-stranded cDNA using a reverse transcriptase.
 - For subsequent amplification, two PCR primers are designed to flank the unknown sequence.
 - One PCR primer is complementary to known sequences within the gene, and a second primer is complementary to an "anchor" site (anchor primer).
- The anchor site may be present naturally, such as the poly(A) tail of most mRNAs, or can be added in vitro after completion of the reverse transcription step.
- The anchor primer also can carry adaptor sequences, such as restriction enzyme recognition sites, to facilitate cloning of the amplified product.

Two general RACE strategies exist:

Amplification using these two PCR primers results in a product that spans the unknown 5' or 3' cDNA sequence,

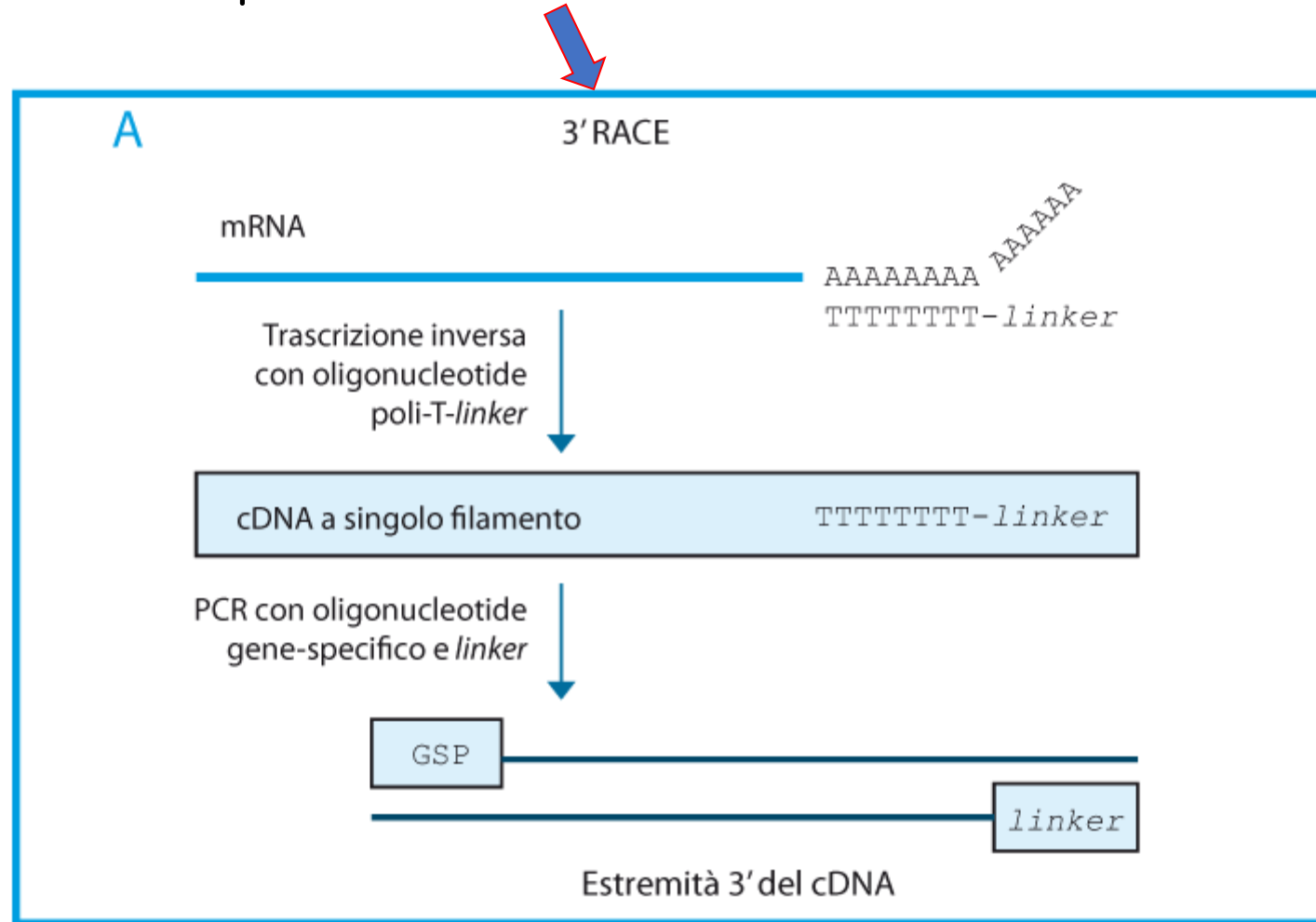
→ and sequencing this product will reveal the unknown sequence.

The information obtained from partial cDNA sequences then can be used to assemble the full-length cDNA sequence (Frohman *et al.* 1988; Loh *et al.* 1989; Ohara *et al.* 1989).

Numerous variations of the original protocols have been published (Troutt *et al.* 1992; Edwards *et al.* 1991; Edwards *et al.* 1993; Liu and Gorovsky, 1993; Fromont-Racine *et al.* 1993; reviewed in Schaefer, 1995)

GSP: oligonucleotide Gene Specifico

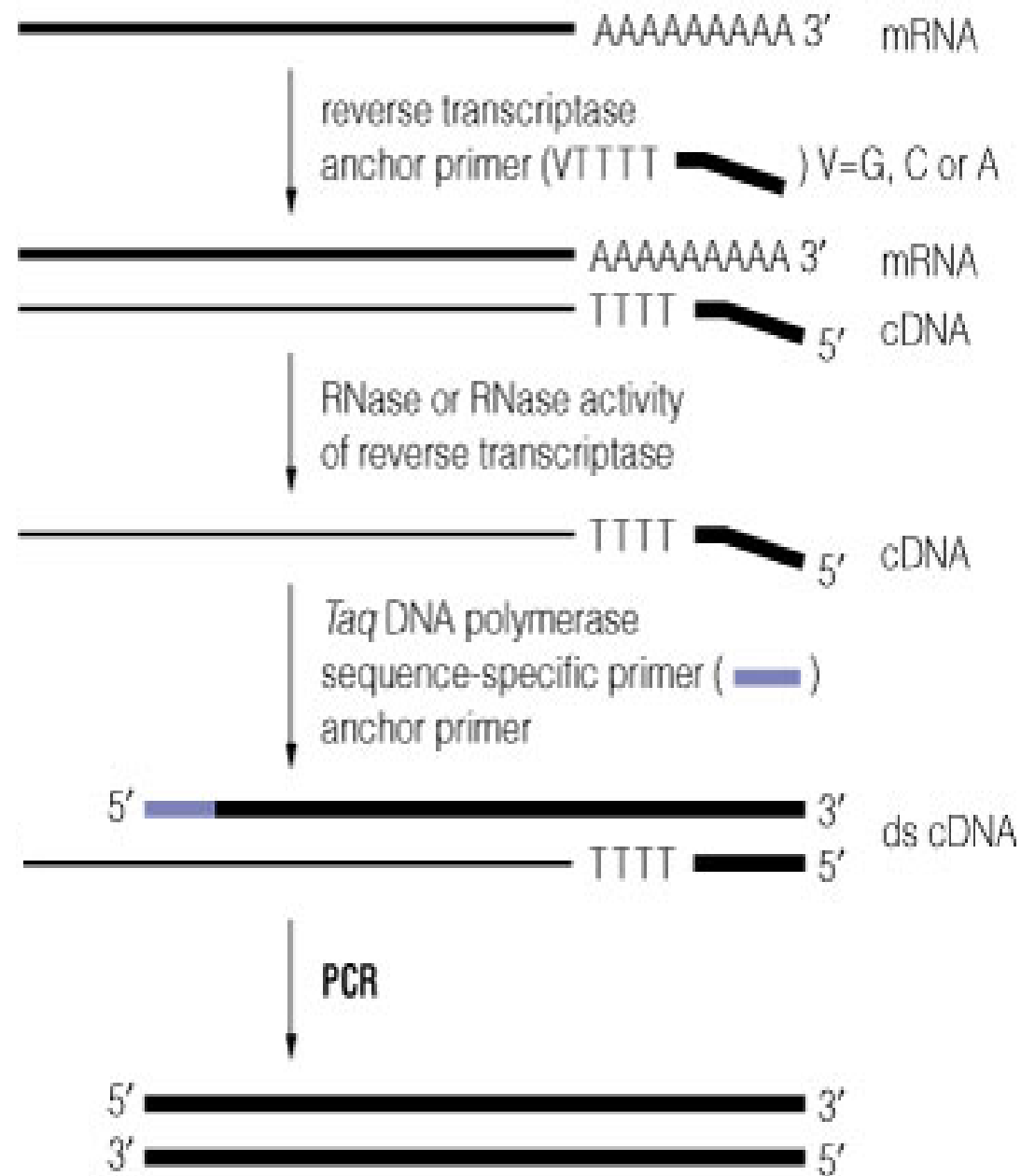
UTILIZZATO per la PCR: 3' RACE



The 3'-RACE procedure uses a modified oligo(dT) primer/adaptor as the reverse transcription primer.

This oligo(dT) primer/adaptor is comprised of an **oligo(dT) sequence**, which anneals to the poly(A)+ tail of the mRNA, and an adaptor sequence at the 5' end. A **single G, C or A** residue at the 3' end ensures that **cDNA synthesis is initiated** only when the primer/adaptor anneals **immediately adjacent to the junction between the poly(A)+ tail and 3' end** of the mRNA.

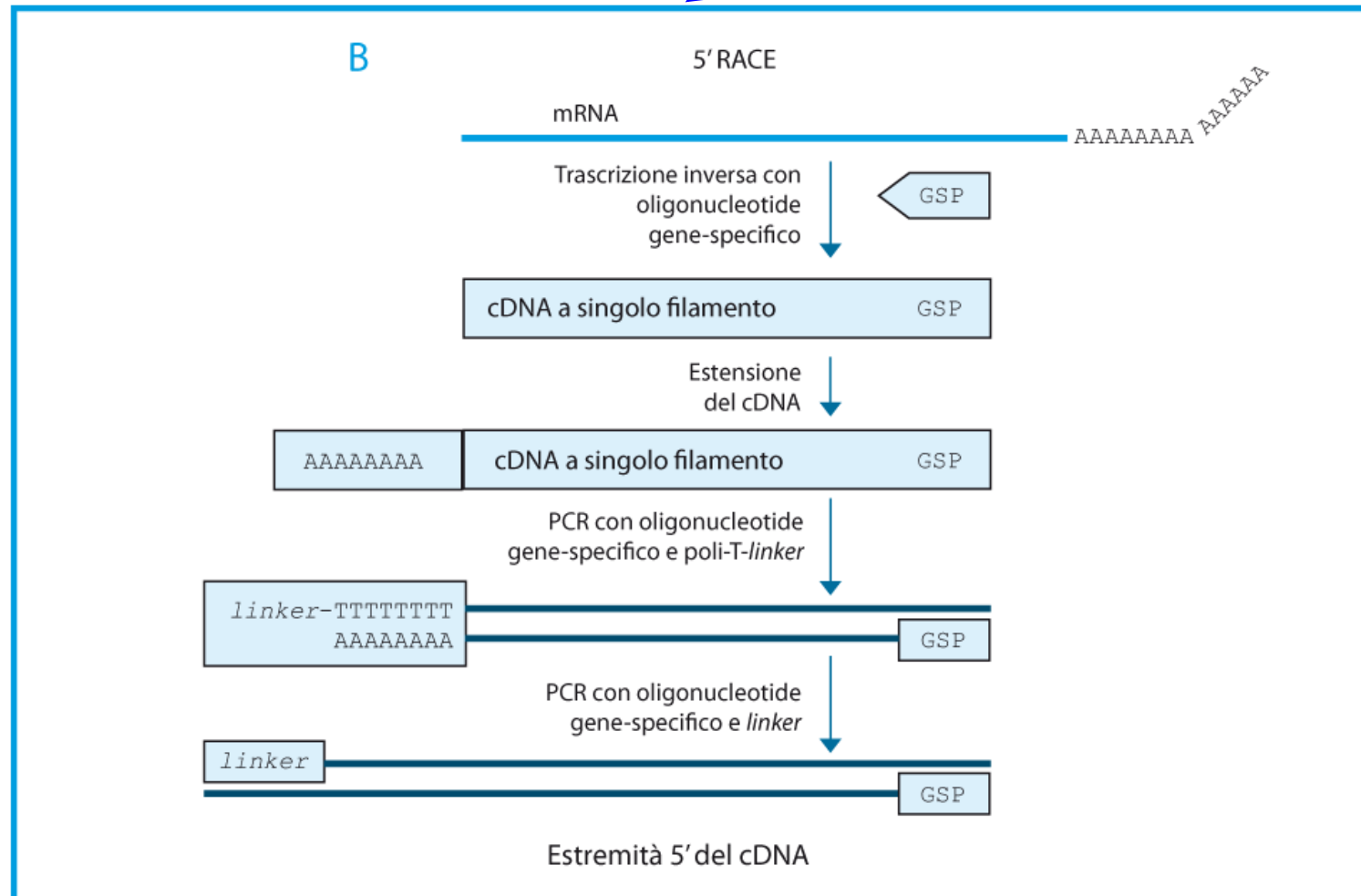
This oligo(dT) primer/adaptor is used as the **anchor primer** in the subsequent amplifications along with a primer complementary to known sequences within the gene.



1441MA04_6A

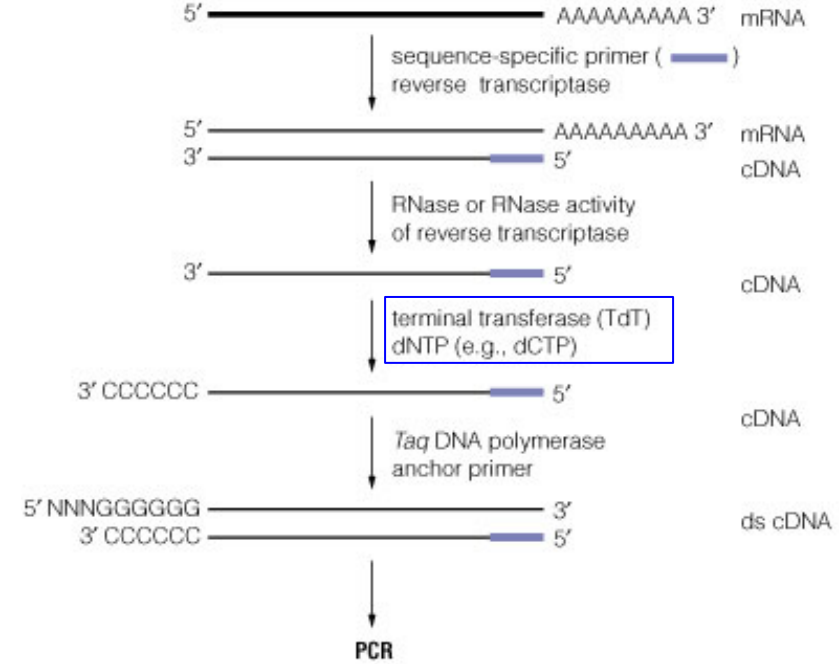
GSP: oligonucleotide Gene Specifico

UTILIZZATO per la PCR: 5' RACE



In 5'RACE the first-strand cDNA synthesis reaction is **primed** using an **oligonucleotide complementary to a known sequence in the gene**.

1) After removing the RNA template, an anchor site at the 3'-end of the single-stranded cDNA is created **using terminal deoxynucleotidyl transferase**, which adds a nucleotide tail.



2) A **typical amplification reaction follows using an anchor primer complementary to the newly added tail (added by T4 RNA Ligase)** and another primer complementary to a known sequence within the gene.

