

CORSO DI GENETICA

INGEGNERIA GENETICA

Roberto Mengentili
Università di Urbino "Carlo Bo"

Tecniche di DNA ricombinante: gli enzimi di restrizione

Le tecniche di base del DNA ricombinante fanno prevalentemente uso degli **enzimi di restrizione**.

Gli enzimi di restrizione sono proteine che riconoscono sequenze specifiche (**palindromiche**) sul DNA e lo tagliano in loro corrispondenza su entrambi i filamenti.

Si sono evoluti nei batteri come difesa contro DNA *estraneo* (per esempio, quello virale).

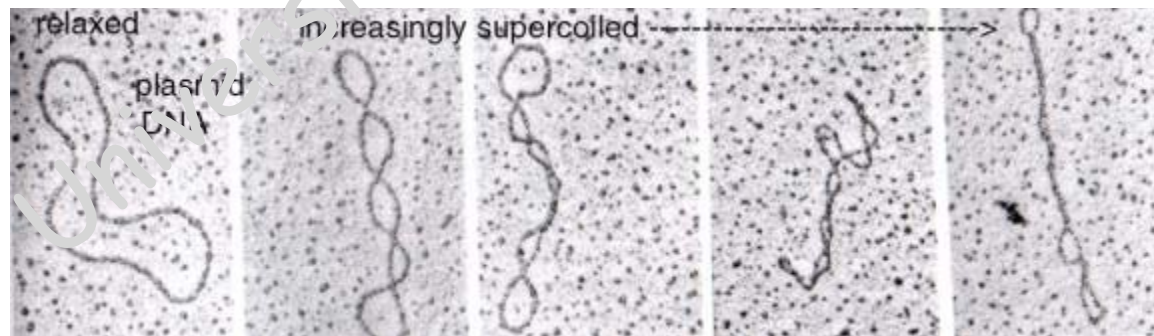
Dopo il taglio, la molecola di DNA può avere estremità nette (**blunt ends**) o sfalsate al 3' o al 5' (**overhangs**).

Queste estremità libere possono essere riunite grazie alle varie DNA ligasi.

Tecniche di DNA ricombinante: i plasmidi

I frammenti ottenuti dopo la **digestione** con enzimi di restrizione possono essere ligati all'interno di **vettori** plasmidici.

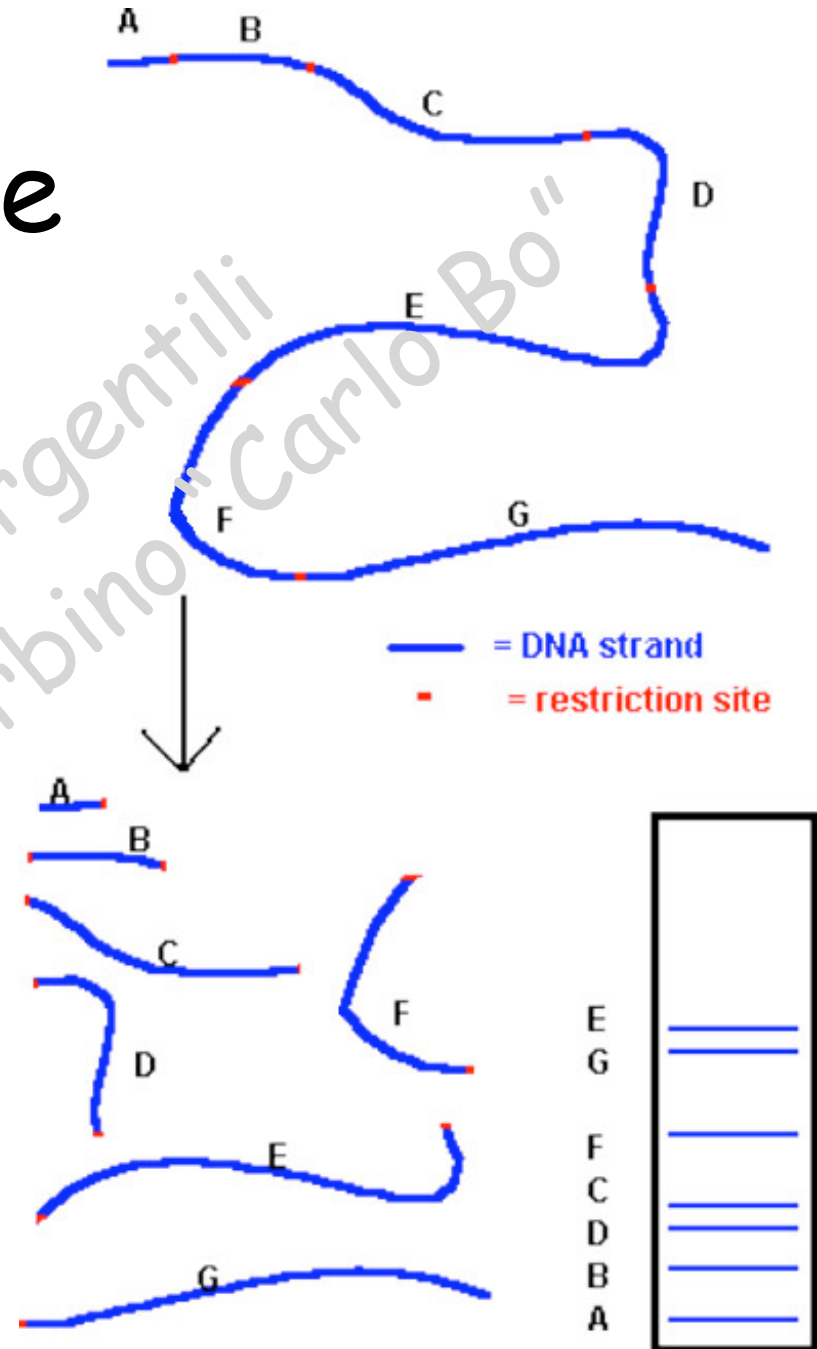
I plasmidi sono anelli di DNA, sono presenti soprattutto nei batteri, **NON** fanno parte del genoma batterico, ma spesso conferiscono al batterio che li ospita un vantaggio (resistenza ad antibiotici, a virus, possibilità di metabolizzare substrati *difficili*, difesa da agenti tossici come i metalli pesanti, ecc.).



Fase 1: digestione del DNA

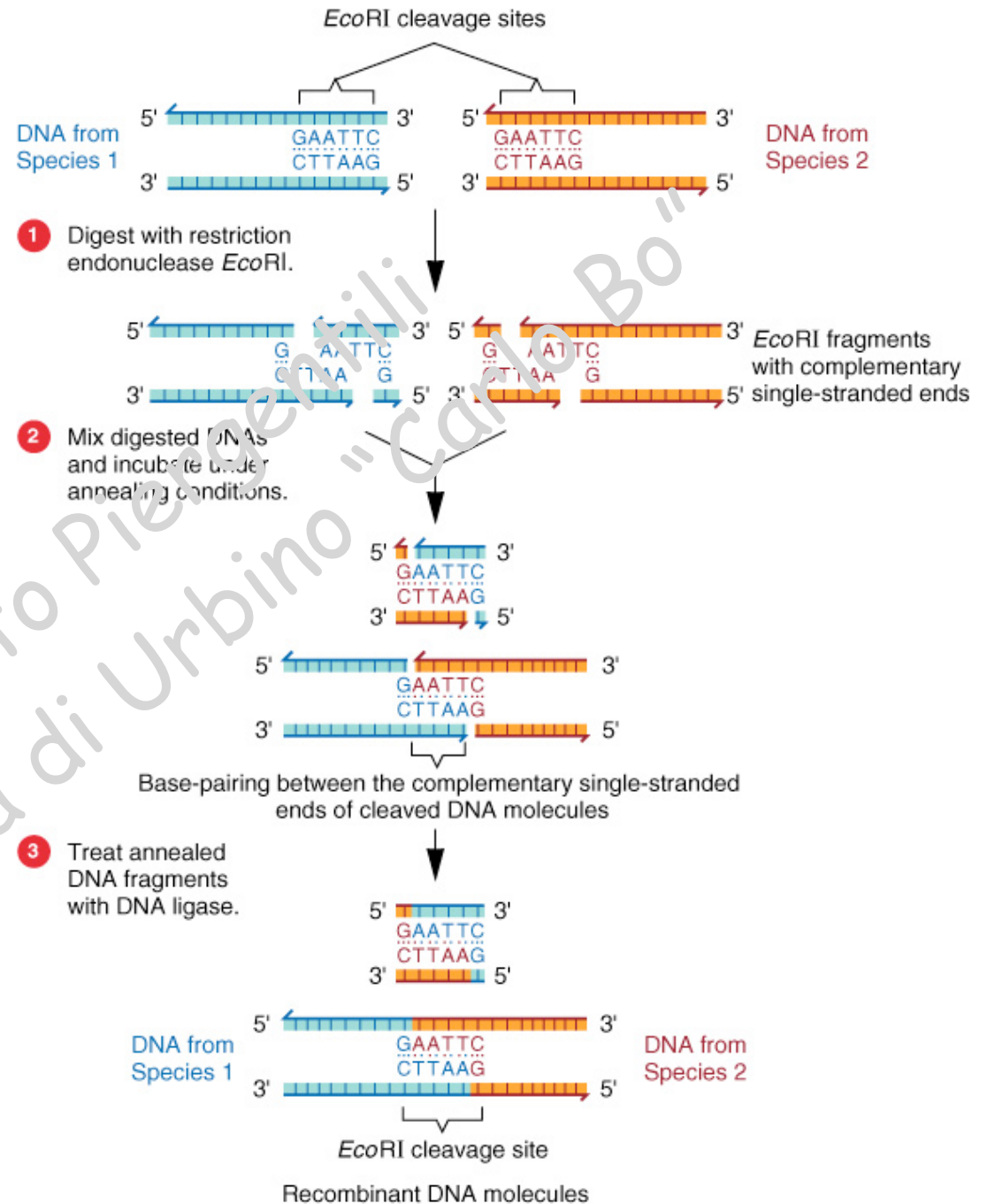
Il numero e la lunghezza dei frammenti dipende dalla frequenza della sequenza sul DNA (sequenze più corte sono statisticamente più frequenti), secondo la regola 4^n .

Si trattano separatamente (ma con lo stesso enzima) il DNA di interesse e il vettore ricevente.



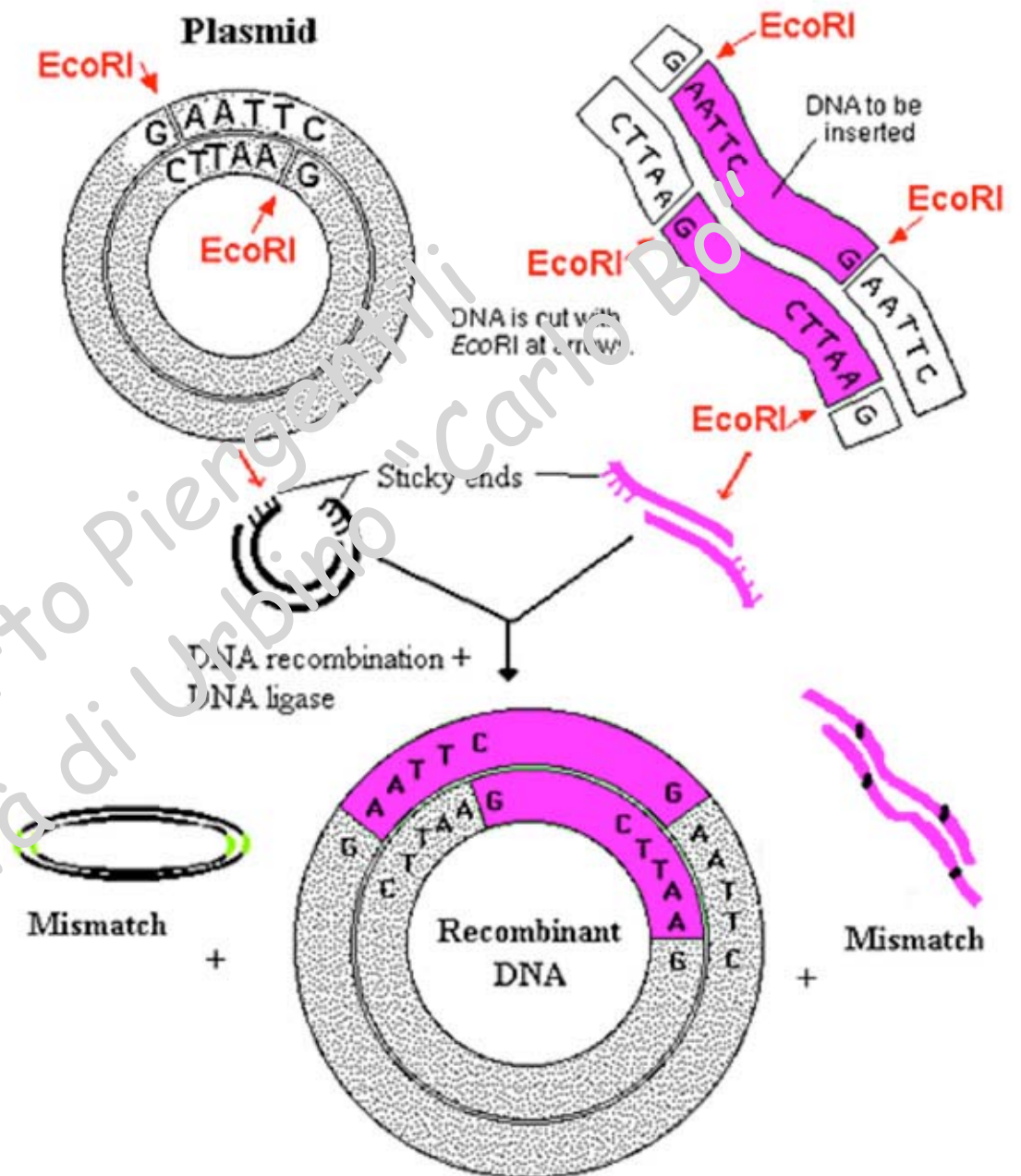
Fase 2: ligazione del DNA

EcoRI è uno degli enzimi più usati. Deriva da *E. coli* (da cui il nome) e riconosce l'esamero GAATTC. Dopo il taglio lascia un *overhang* di 5 pb.



Fase 3: il clonaggio *in vitro*

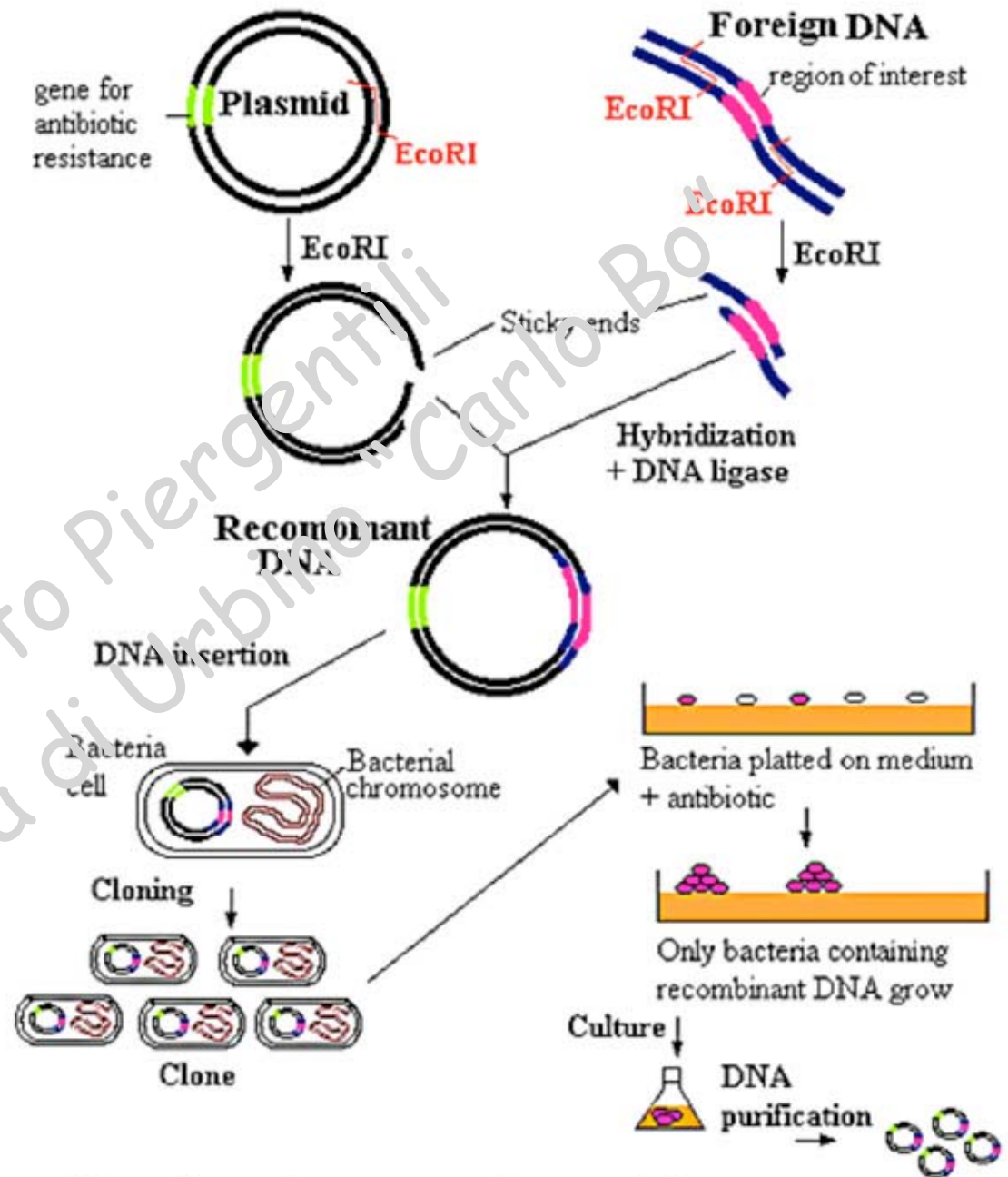
Si fa una miscela di DNA da inserire e plasmide ricevente. Tra i vari prodotti (richiusura del plasmide, ligazione del DNA donatore, polimeri ibridi) ci sarà anche il plasmide ricombinante di interesse.



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Fase 4: selezione del plasmide di interesse

Si usano plasmidi contenenti una o più resistenze agli antibiotici; trasfettando le cellule batteriche con la miscela di ligazione e piastrandole su terreno selettivo, solo quelle con la resistenza potranno crescere; si seleziona poi il plasmide ricombinante.



Cloning into a plasmid

Il polylinker

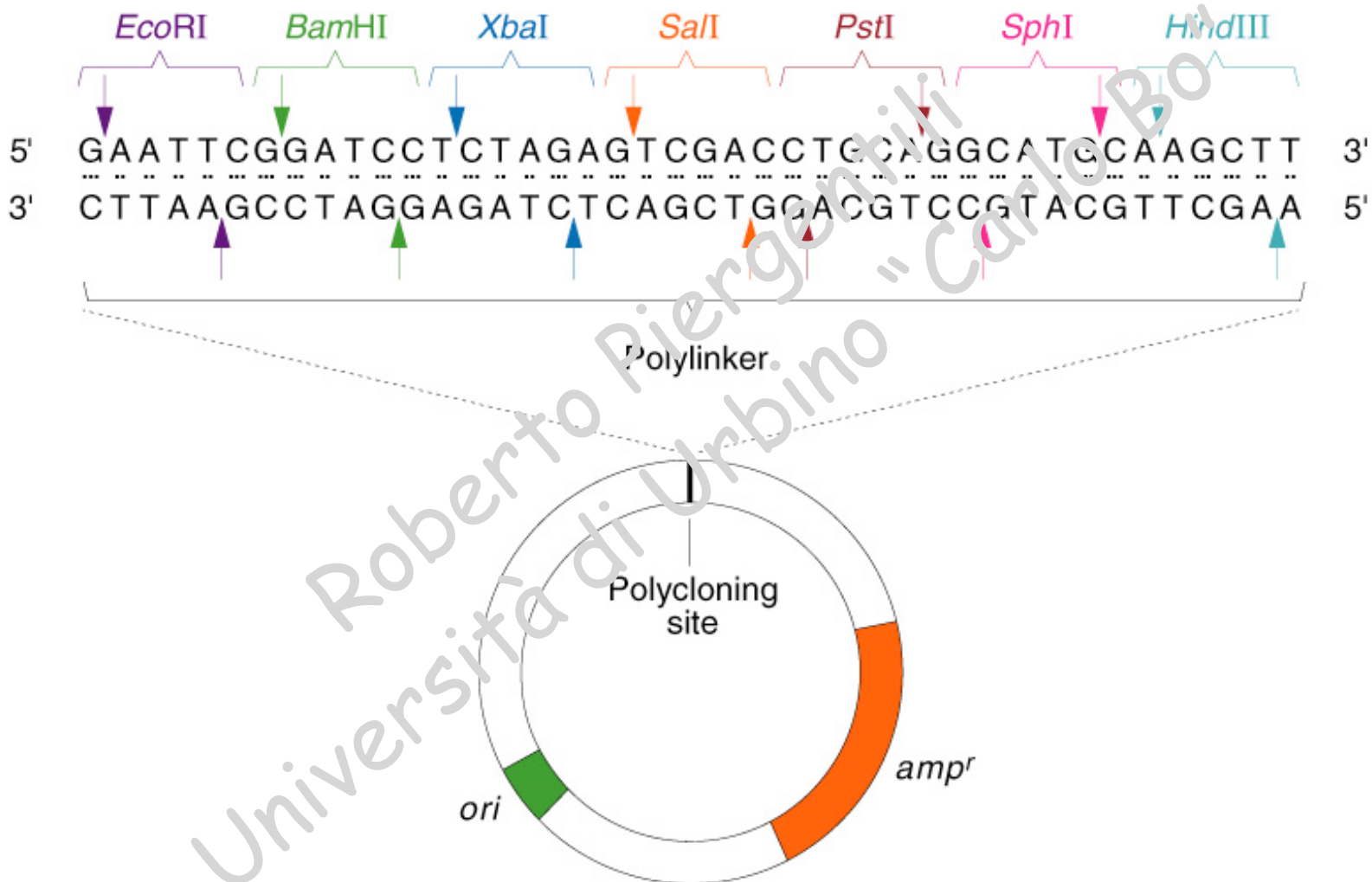


Figure 20.3 Structure of a polycloning site in a cloning vector. The phosphodiester bonds cleaved by the restriction endonucleases are indicated by arrows. The restriction endonucleases shown are produced by the following microorganisms: *EcoRI*, *Escherichia coli* strain RY13; *BamHI*, *Bacillus amyloliquefaciens* strain H; *XbaI*, *Xanthomonas badrii*; *SalI*, *Streptomyces albus*; *PstI*, *Providencia stuartii*; *SphI*, *Streptomyces phaeochromogenes*; and *HindIII*, *Haemophilus influenzae* strain R_d.

Vettori per l'ingegneria genetica: i cosmidi

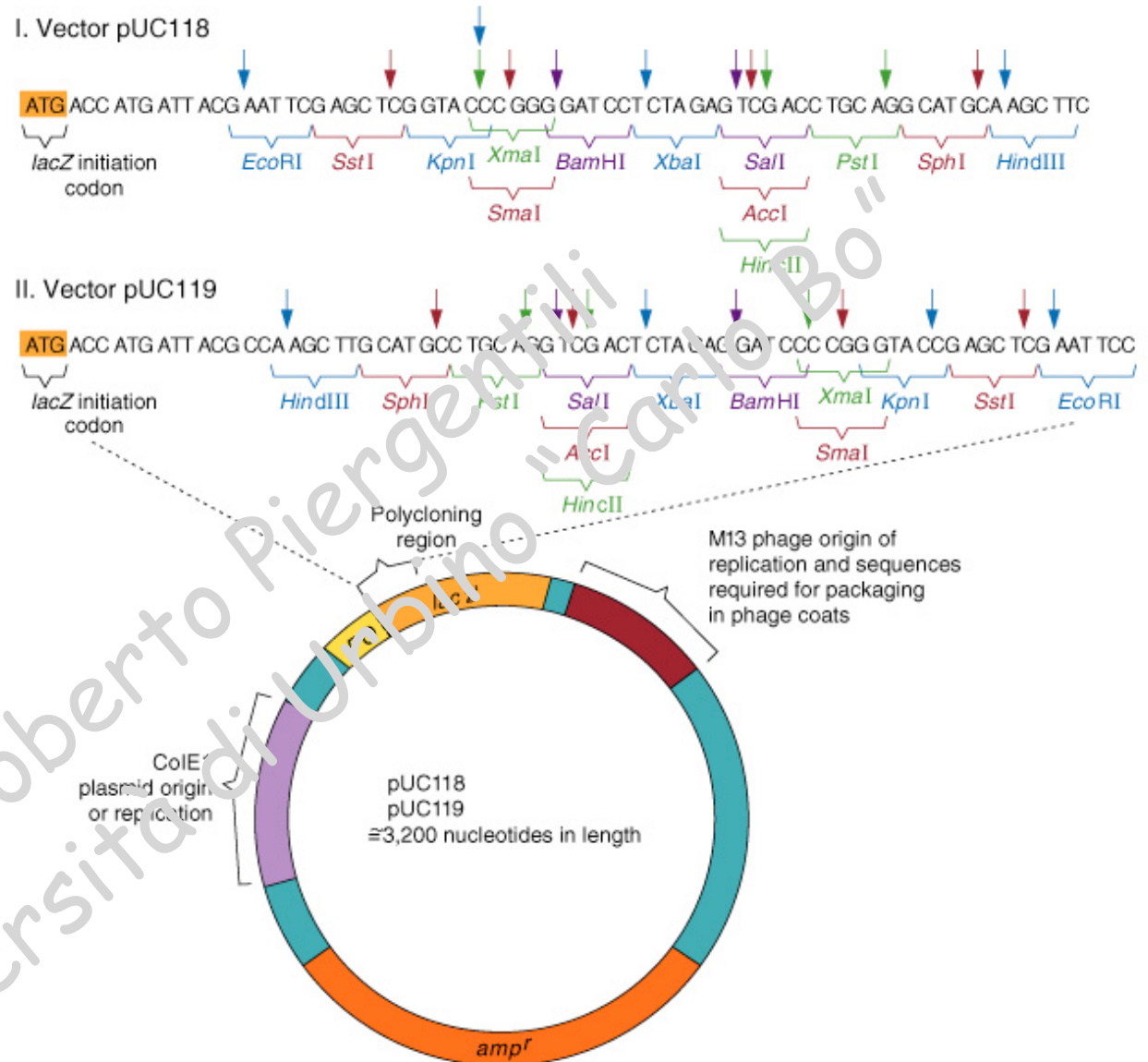


Figure 20.14 Important components of the phagemid vectors pUC118 and pUC119. *P* and *O* are the promoter (RNA polymerase binding site) and operator (repressor binding site) regions that regulate the transcription of the lactose biosynthetic enzymes (Chapter 23). Gene segment *lacZ'* encodes the amino terminal 147 amino acids of β -galactosidase. The polycloning site lies within *lacZ'* and contains a cluster of restriction enzyme cleavage sites (top). The ColE1 plasmid origin controls replication in the absence of helper phage, whereas the M13 origin controls replication in the presence of helper phage.

Gli YACs

Utilizzo: clonare geni eucariotici (per esempio con introni).

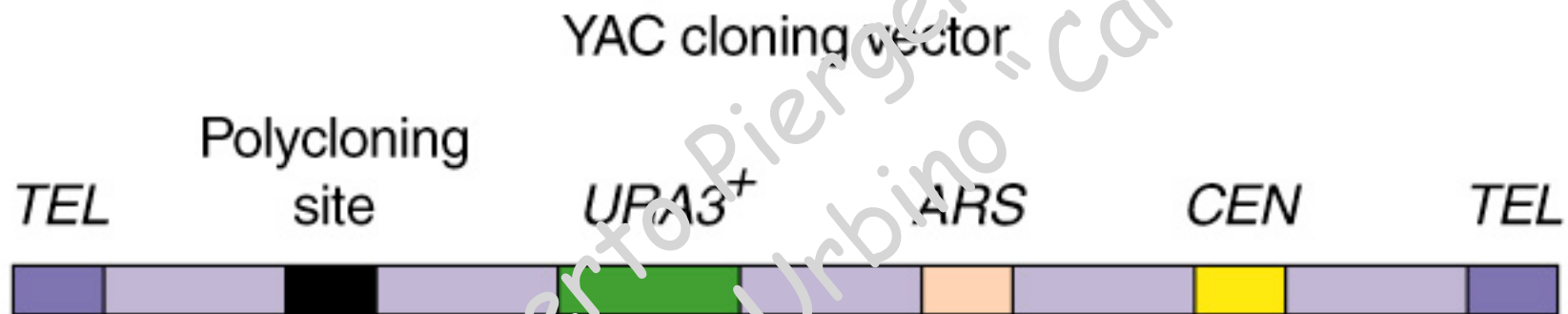
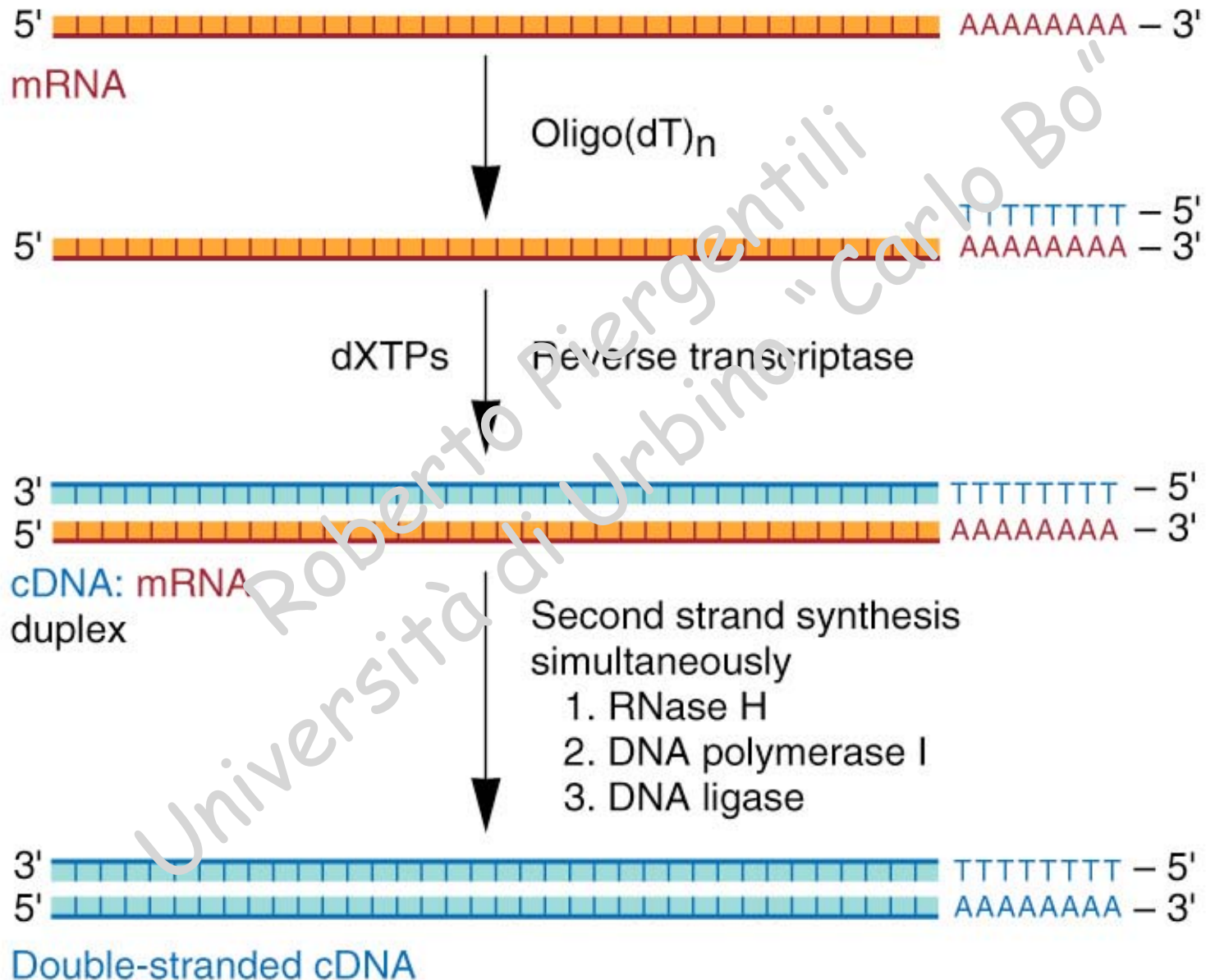


Figure 20.8 Structure of a YAC cloning vector. The components are: (1) *ARS*, autonomously replicating sequence (a yeast origin of replication), (2) *CEN*, a yeast centromere, (3) *TEL*, a yeast telomere, (4) *URA3*⁺, a wild-type gene required for the biosynthesis of uracil, and (5) the polycloning site, containing the recognition and cleavage sites for a set of restriction endonucleases.

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

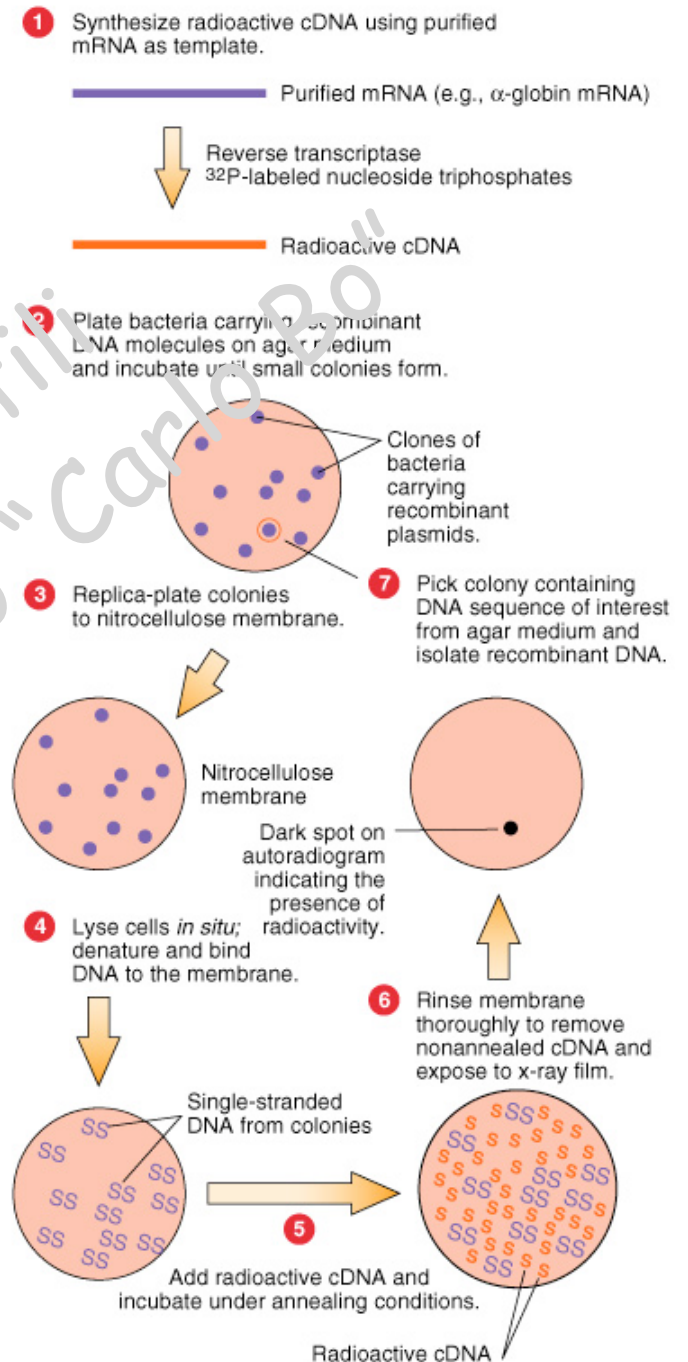
TEL: sequenze telomeriche; URA3⁺: marcatore per selezione; CEN: sequenze centromeriche; ARS: sequenza di replicazione autonoma; Polycloning site → qui inserisco il mio gene.

Librerie di espressione

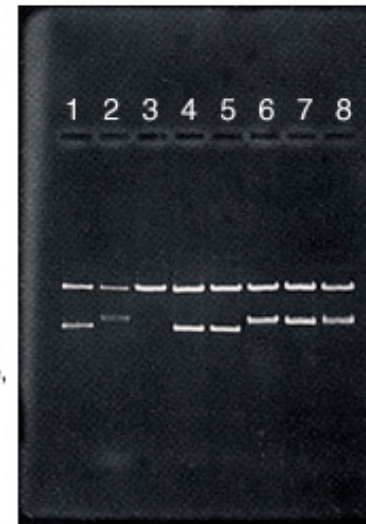
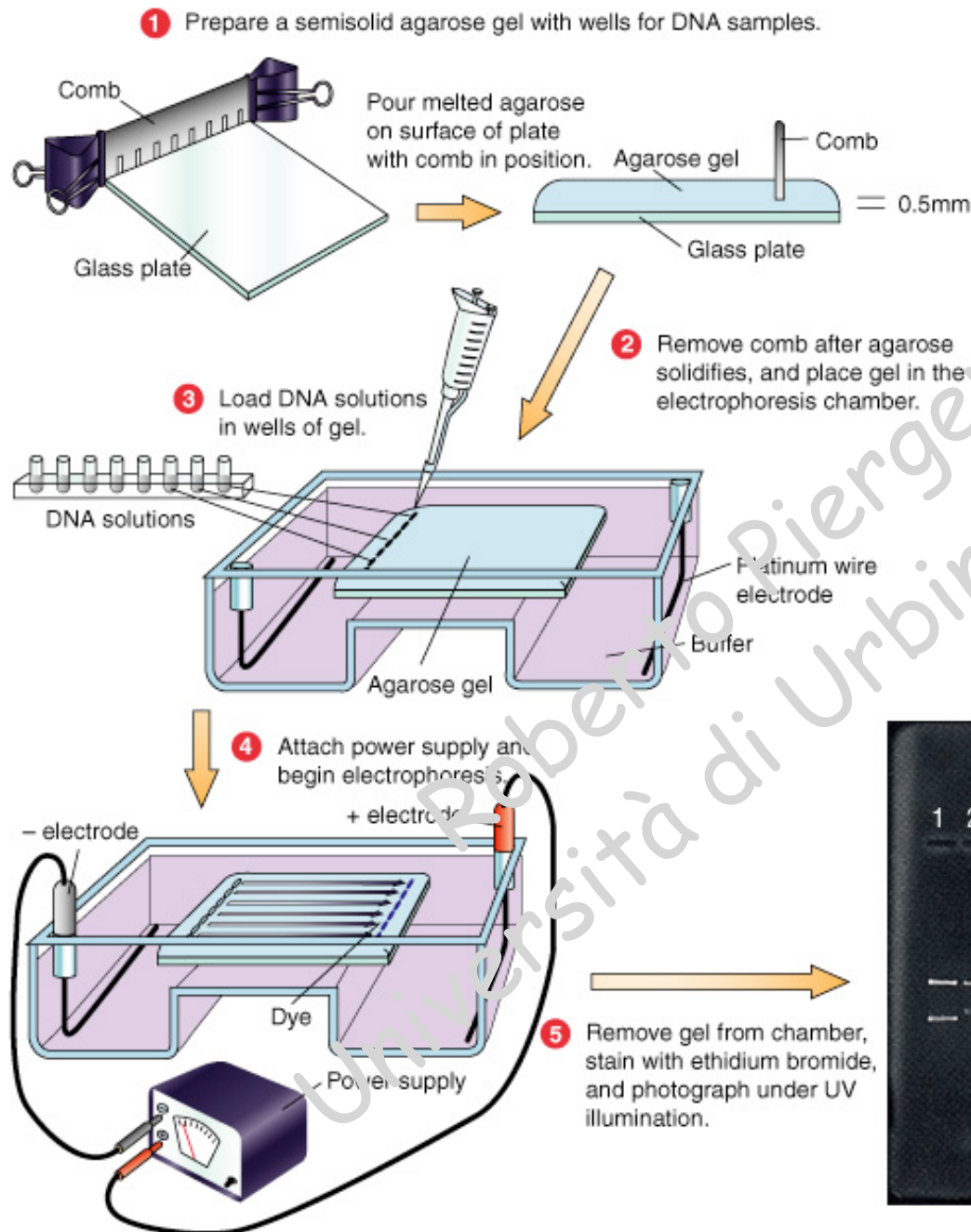


Screening di una library di cDNA

Cercando il DNA per *ibridazione in situ* in batteri in cui è stato inserito per clonazione il corrispondente plasmide, si può risalire a come e quando il corrispondente mRNA era espresso; per questo si chiamano anche **librerie di espressione**.



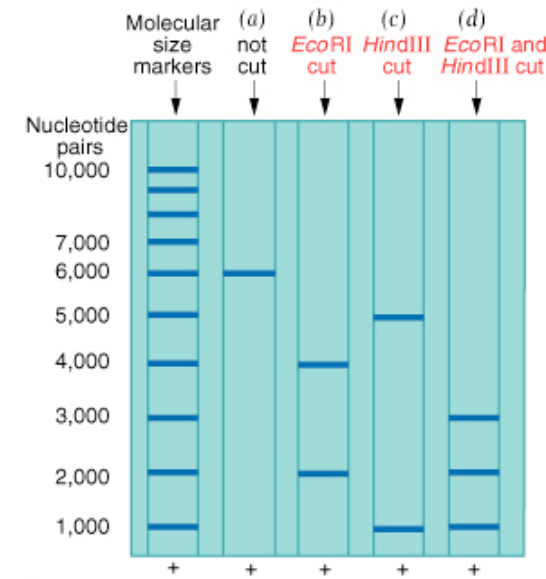
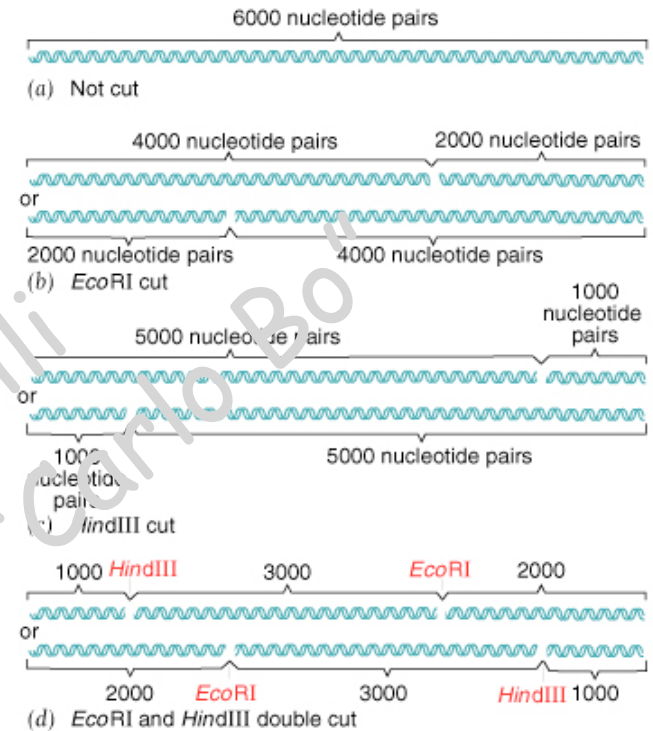
L'elettroforesi su gel di agarosio



Esiste una relazione **logaritmica** tra altezza della banda e sua lunghezza (ovvero peso molecolare).

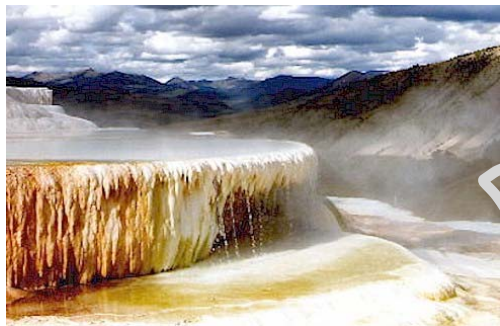
La mappa di restrizione

Tagliando lo stesso frammento di DNA con più enzimi di restrizione, singolarmente e a coppie, e analizzando poi le bande ottenute su un gel di agarosio, si può risalire alla disposizione dei siti nel frammento integro originale. La mappa può essere sia di DNA circolare che lineare.

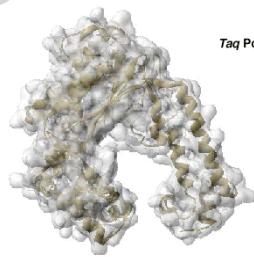
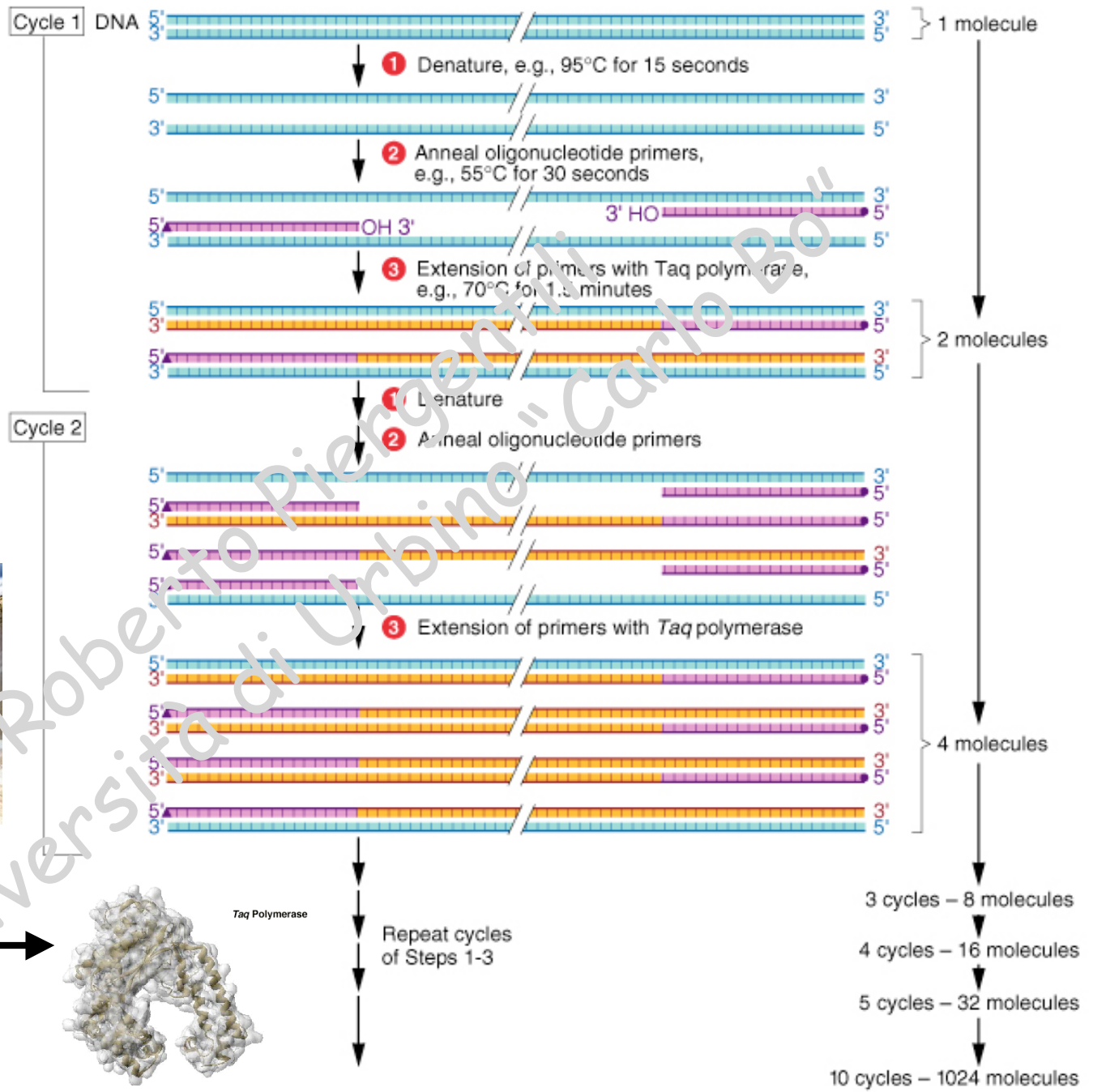


(e)

La Polymerase Chain Reaction



La TAQ polimerasi è estratta dal *Termophilus aquaticus*.



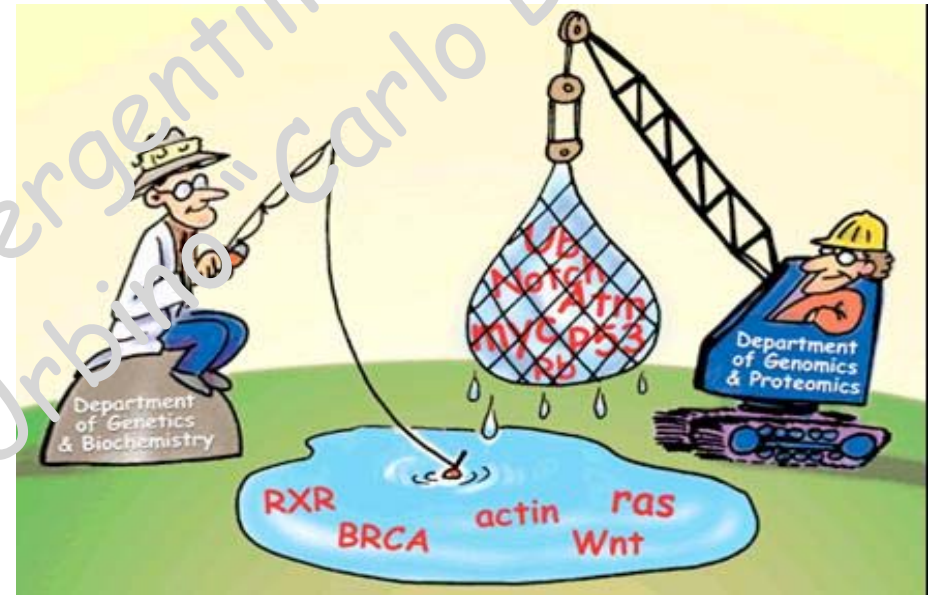
Taq Polymerase

Repeat cycles of Steps 1-3

Genomica e Proteomica

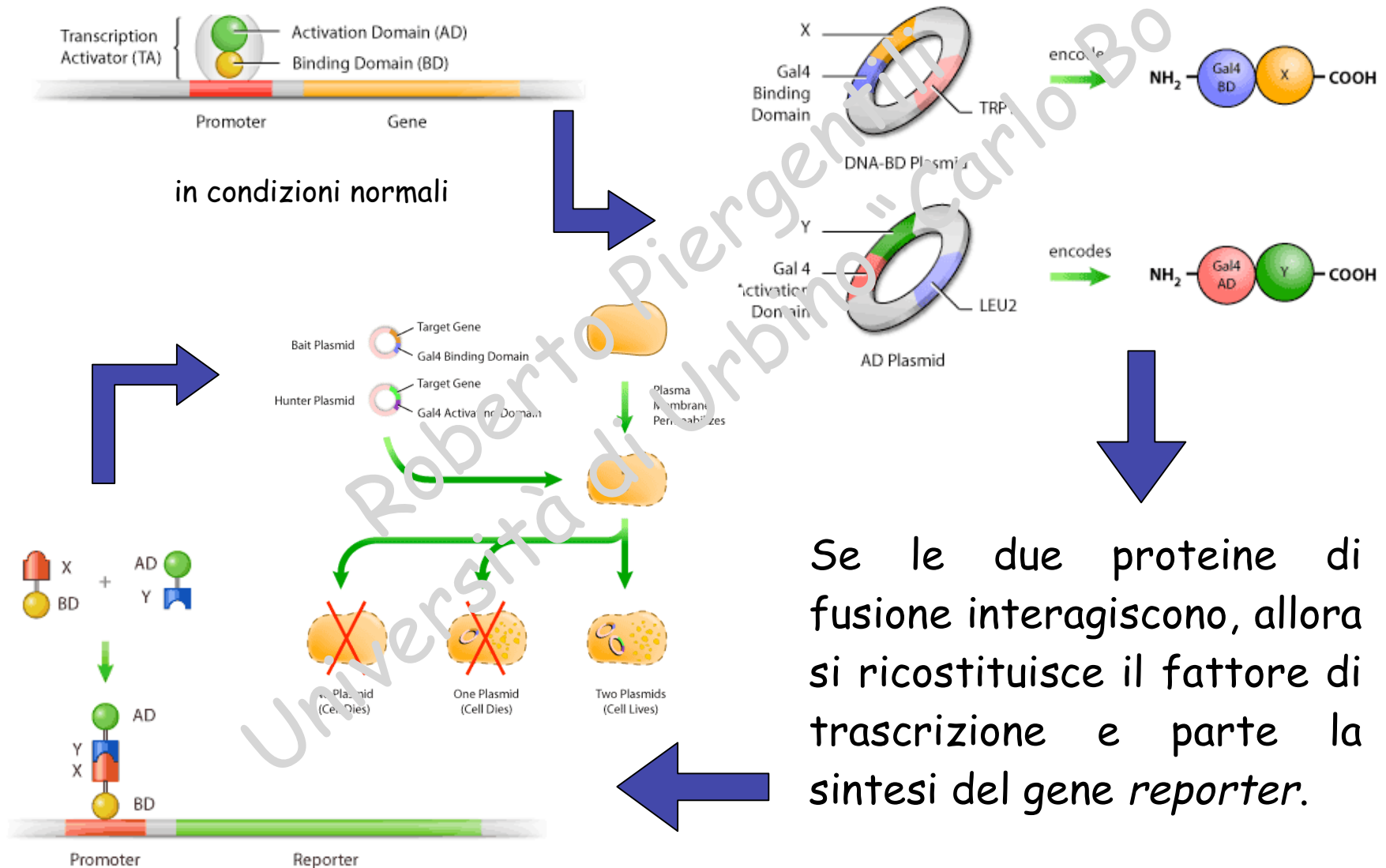
La genomica studia il **genoma**, cioè il DNA di un organismo, la sua composizione e organizzazione.

La proteomica studia il **proteoma**, cioè la composizione in proteine di una cellula, tessuto, organismo, e le loro **interazioni**.



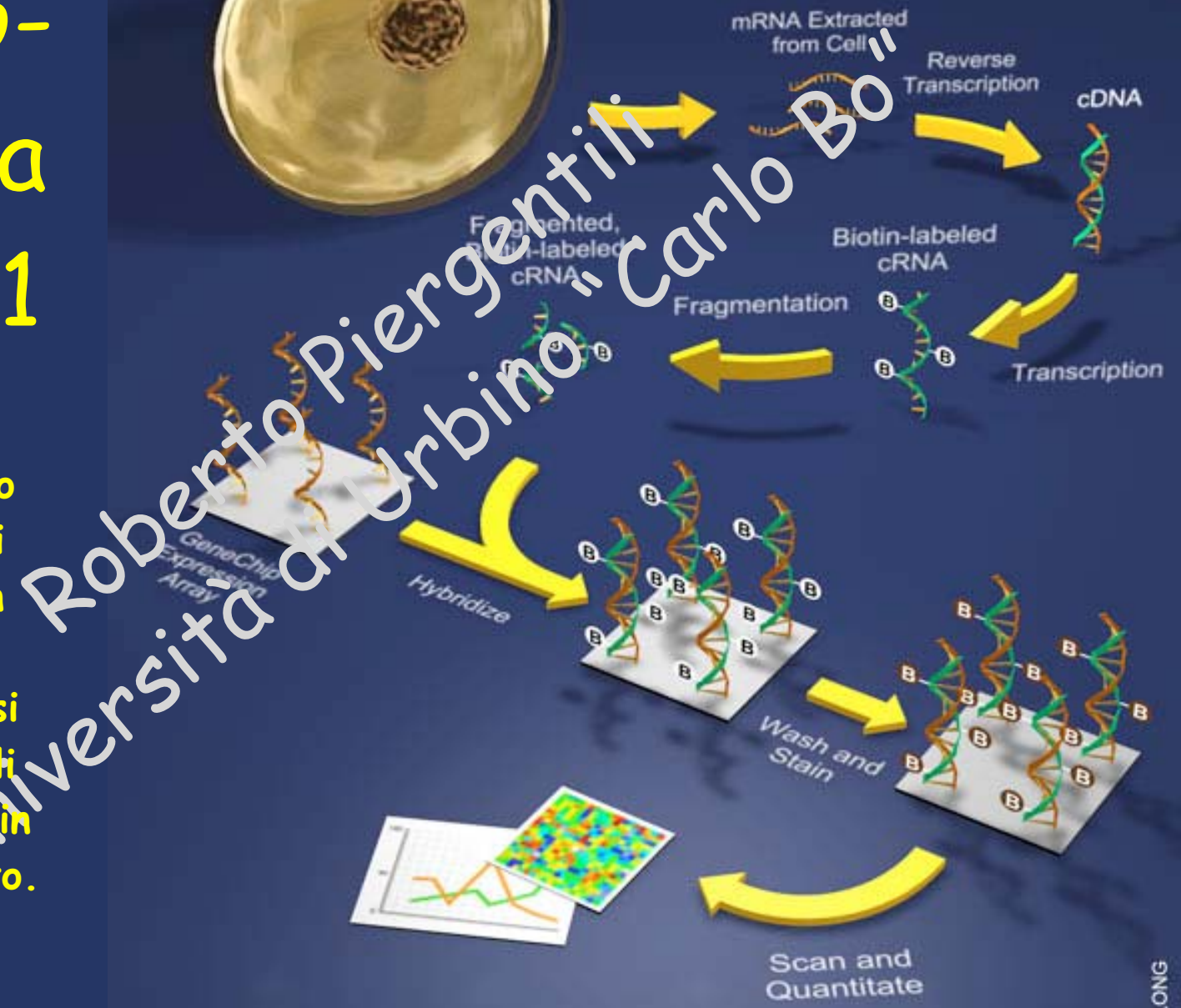
Per ogni specie, il genoma è uno (alleli a parte), mentre i proteomi possono essere molti e variare nello spazio (tessuti diversi) e nel tempo (sviluppo embrionale), così come in seguito alle interazioni con l'ambiente (risposte ormonali, immunitarie, ecc.).

Lo yeast two hybrid system



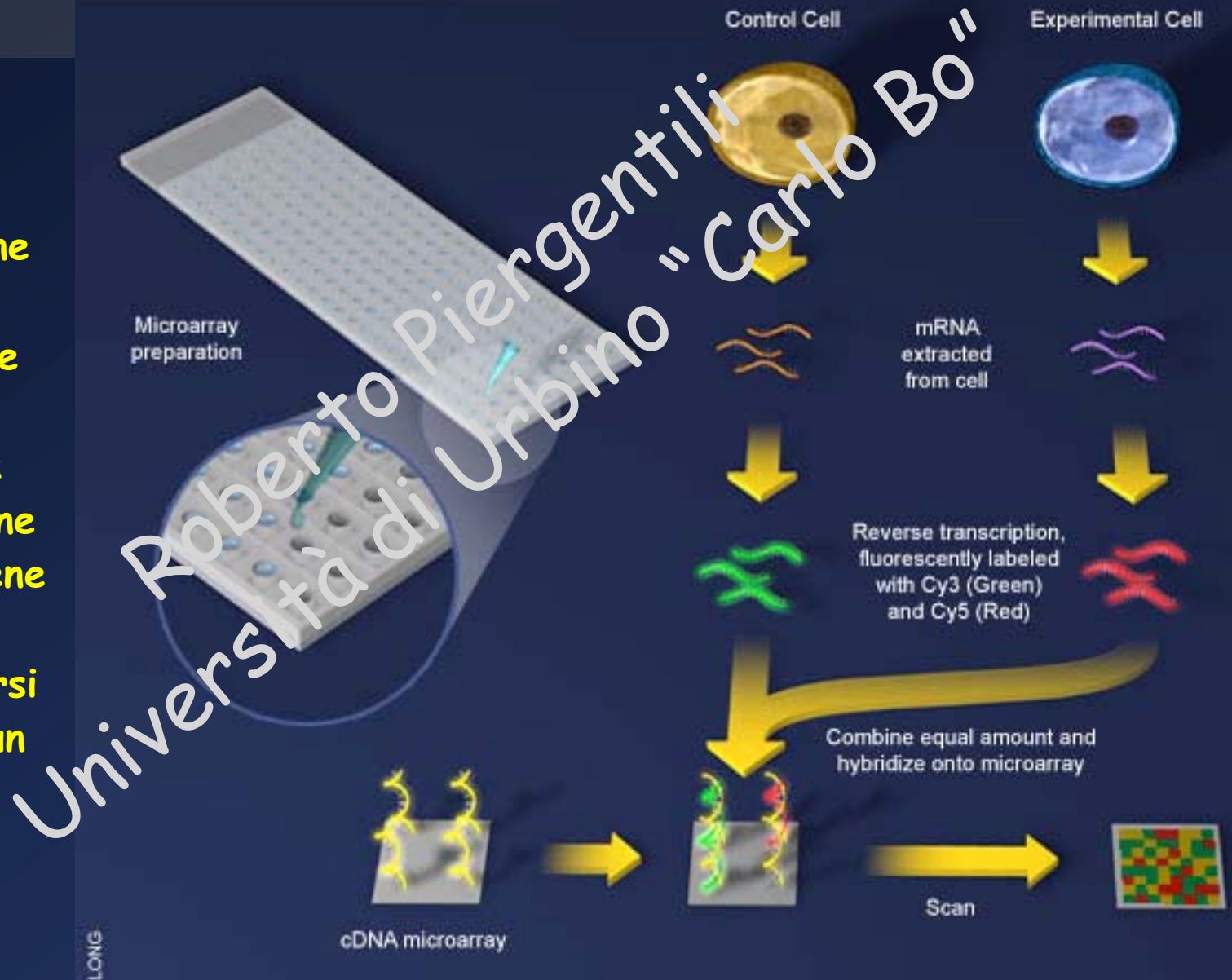
I micro-arrays a DNA - 1

Se sul chip sono presenti tutti i trascritti di un organismo (trascrittoma) si può vedere quali geni sono attivi in un certo momento.



I microarrays a DNA - 2

In base all'intensità dell'ibridazione è anche possibile fare una stima quantitativa dell'espressione di un certo gene in tessuti o momenti diversi rispetto ad un controllo.



I microarray a proteine

Analytical versus functional protein microarrays. **a**, Analytical protein microarray. Different types of ligands, including antibodies, antigens, DNA or RNA aptamers, carbohydrates or small molecules, with high affinity and specificity, are spotted down onto a derivatized surface. These chips can be used for monitoring protein expression level, protein profiling and clinical diagnostics. Similar to the procedure in DNA microarray experiments, protein samples from two biological states to be compared are separately labelled with red or green fluorescent dyes, mixed, and incubated with the chips. Spots in red or green colour identify an excess of proteins from one state over the other. **b**, Functional protein microarray. Native proteins or peptides are individually purified or synthesized using high-throughput approaches and arrayed onto a suitable surface to form the functional protein microarrays. These chips are used to analyse protein activities, binding properties and post-translational modifications. With the proper detection method, functional protein microarrays can be used to identify the substrates of enzymes of interest. Consequently, this class of chips is particularly useful in drug and drug-target identification and in building biological networks. [*Nature* **422**, 208 - 215 (13 March 2003)]

