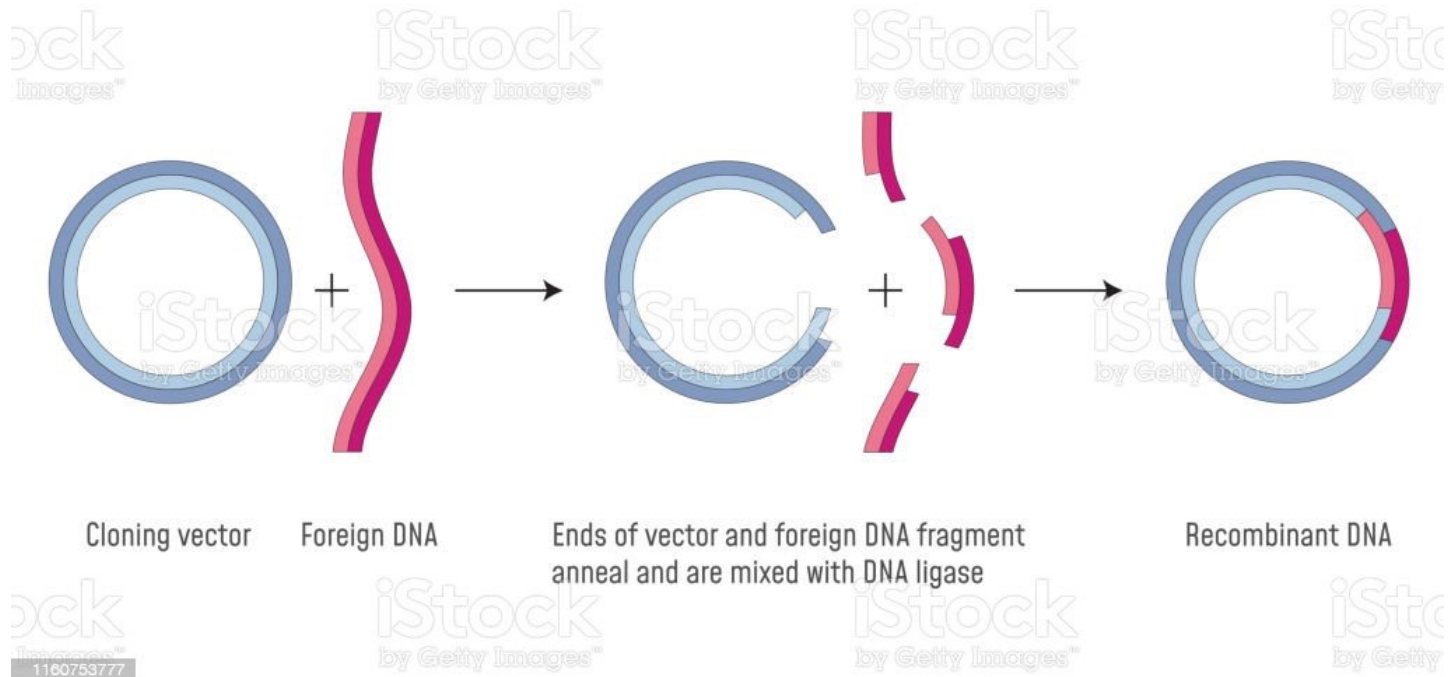
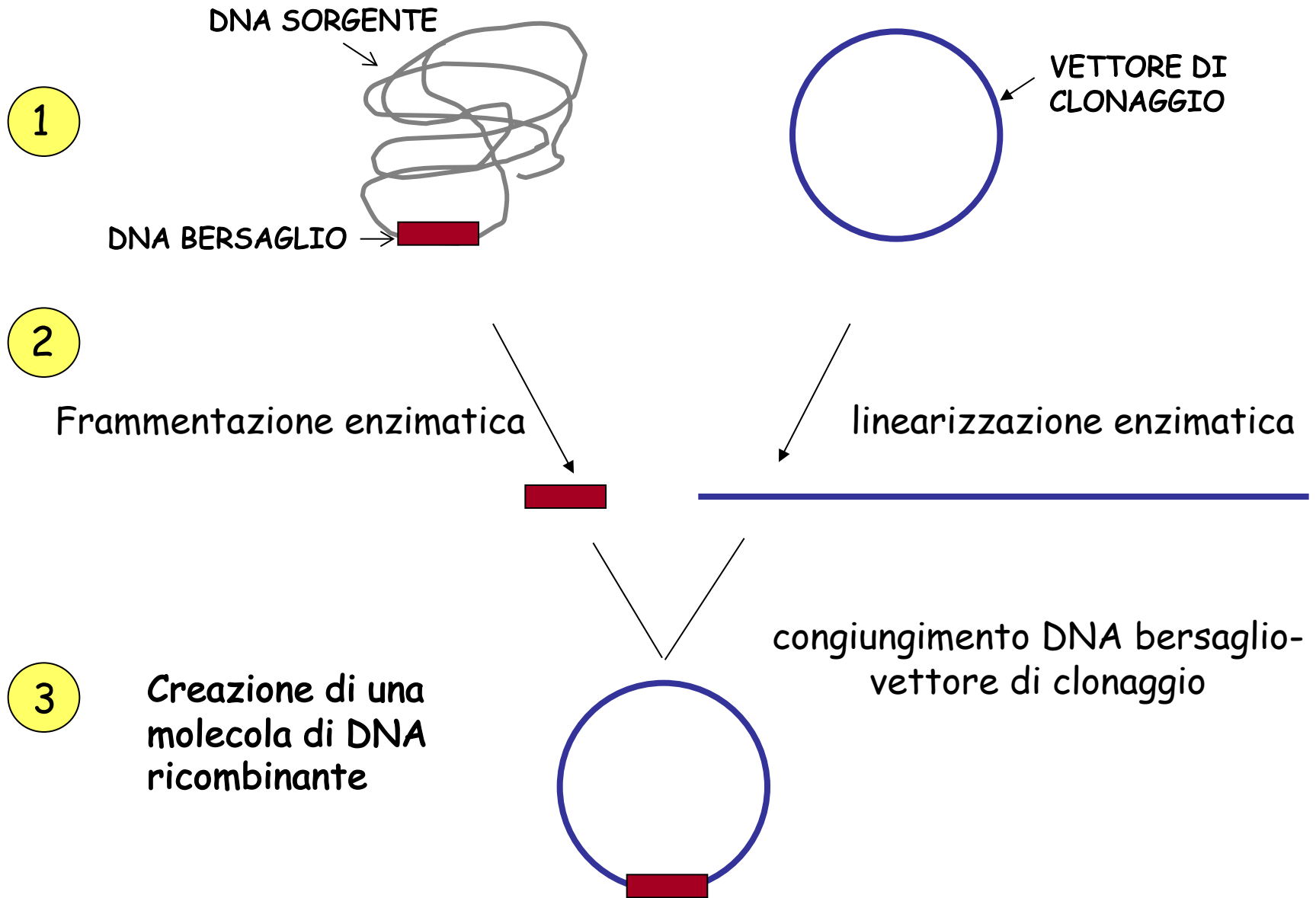


LA TECNOLOGIA del DNA RICOMBINANTE:

dal CLONAGGIO GENICO alle LIBRERIE GENOMICHE

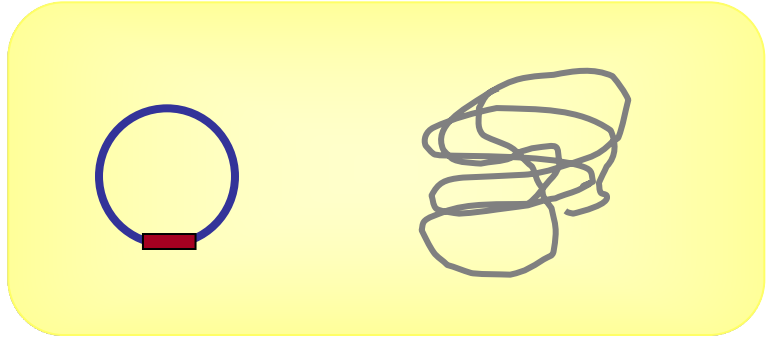
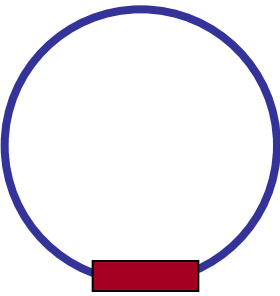


Rappresentazione schematica del clonaggio

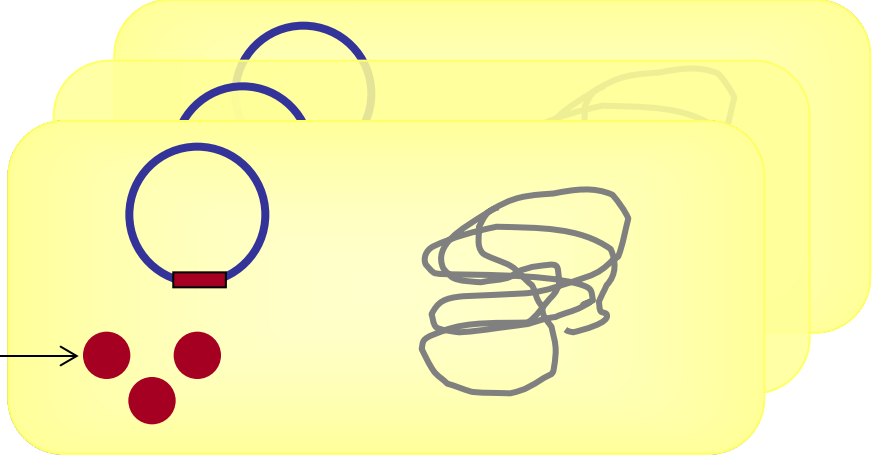
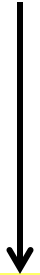


introduzione del DNA nella
cellula ospite (trasformazione) e
isolamento delle cellule con il
gene clonato

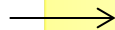
cellula ospite



Produzione della
proteina
dal gene clonato

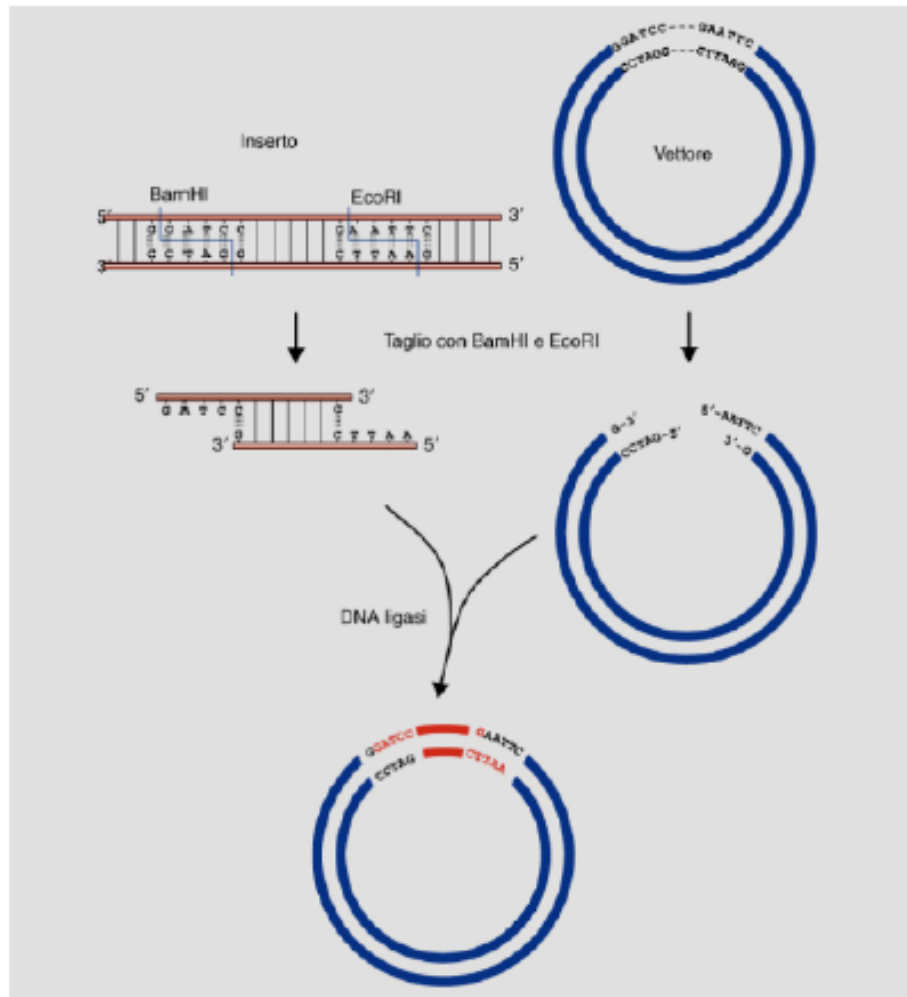


proteina codificata
dal gene clonato



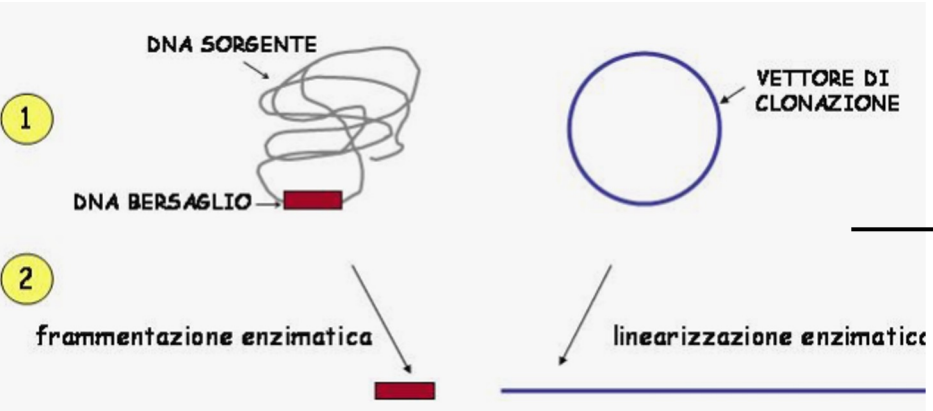
tutto ciò è possibile... grazie alla scoperta delle endonucleasi di restrizione

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE



In the late 70s, Dr. Stan Cohen (Stanford) studying antibiotic resistance plasmids in *E. coli*, and Dr. Herb Boyer (UCSF) studying restriction enzymes, met at a meeting and realized that they could use restriction enzymes to cut both plasmid DNA as well as DNA containing a gene of interest, and combine the DNAs so that the "sticky ends" of each DNA could be joined, or "spliced", to make a recombinant DNA (ie bacteria - human).

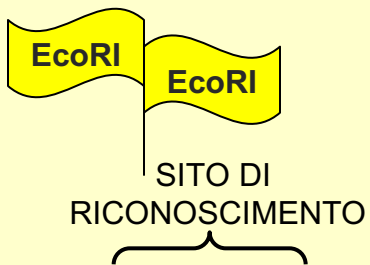
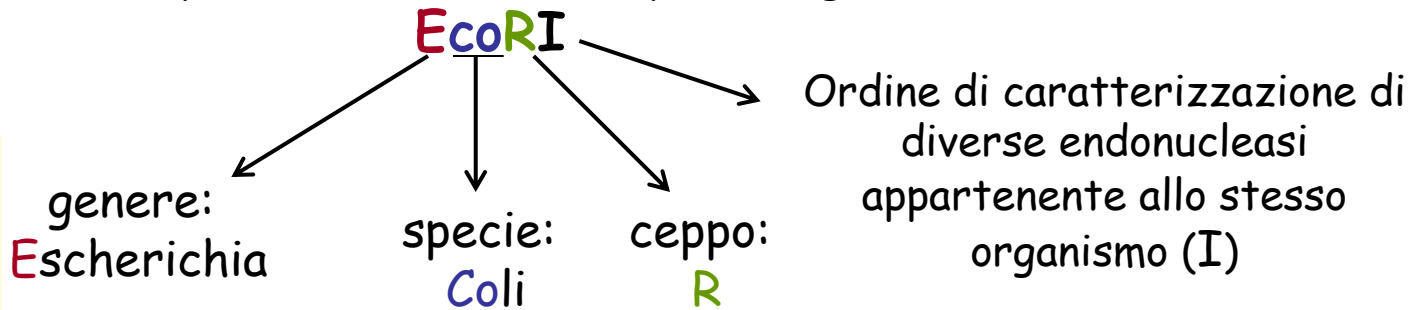
Le Endonucleasi di Restrizione



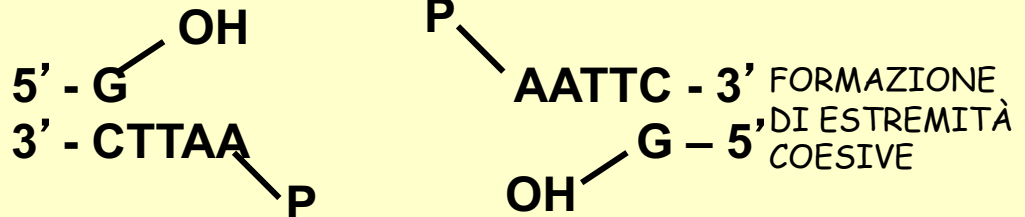
Enzimi batterici: endonucleasi di TIPO II:

- Riconoscono e tagliano corte sequenze di DNA (4-8bp);
- le sequenze riconosciute sono palindromiche, cioè risultano uguali se lette su ogni filamento nella stessa direzione
- il taglio produce estremità piatte o coesive

Esempio di una delle prime endonucleasi di tipo II meglio caratterizzate:



PRODOTTI



Le Endonucleasi di Restrizione

Enzima	Sito di riconoscimento
EcoR I	G↓AATTC CTTAAG↑
BamH I	G↓GATCC CCTAG↑G
Hind III	A↓AGCTT TTCGA↑A
KPN I	GGTACC↓ C↑CATGG
NOT I	G↓CGGCCGC CGCCGG↑CG
EcoR V	GAT↓ATC CTA↑TAG
Xho I	↓CTCGAG GAGCT↑C

Isoschizomeri

Sebbene gli enzimi di restrizione isolati siano oltre 3500, le sequenze bersaglio che possono essere tagliate sono molte di meno (appena più di duecento). E' evidente che molti enzimi isolati da batteri diversi hanno la stessa specificità di sequenza, sono cioè **isoschizomeri**.

Estremità piatte

Esempio: ***HaellI*** (da *Haemophilus parainfluenzae*)

La sequenza di DNA in doppia elica:

5' -NNNNGGCCNNNN-3'
3' -NNNNCCGGNNNN-5'

viene tagliata nel seguente modo:

5' -NNNNGG pCCNNNN-3'
3' -NNNNCCp GGNNNN-5'

In questo caso il taglio è perfettamente simmetrico. Le estremità piatte sono saldate in modo inefficiente dalla DNA ligasi, perché non restano associate a lungo.

Estremità coesive

Esempio: **EcoRI**

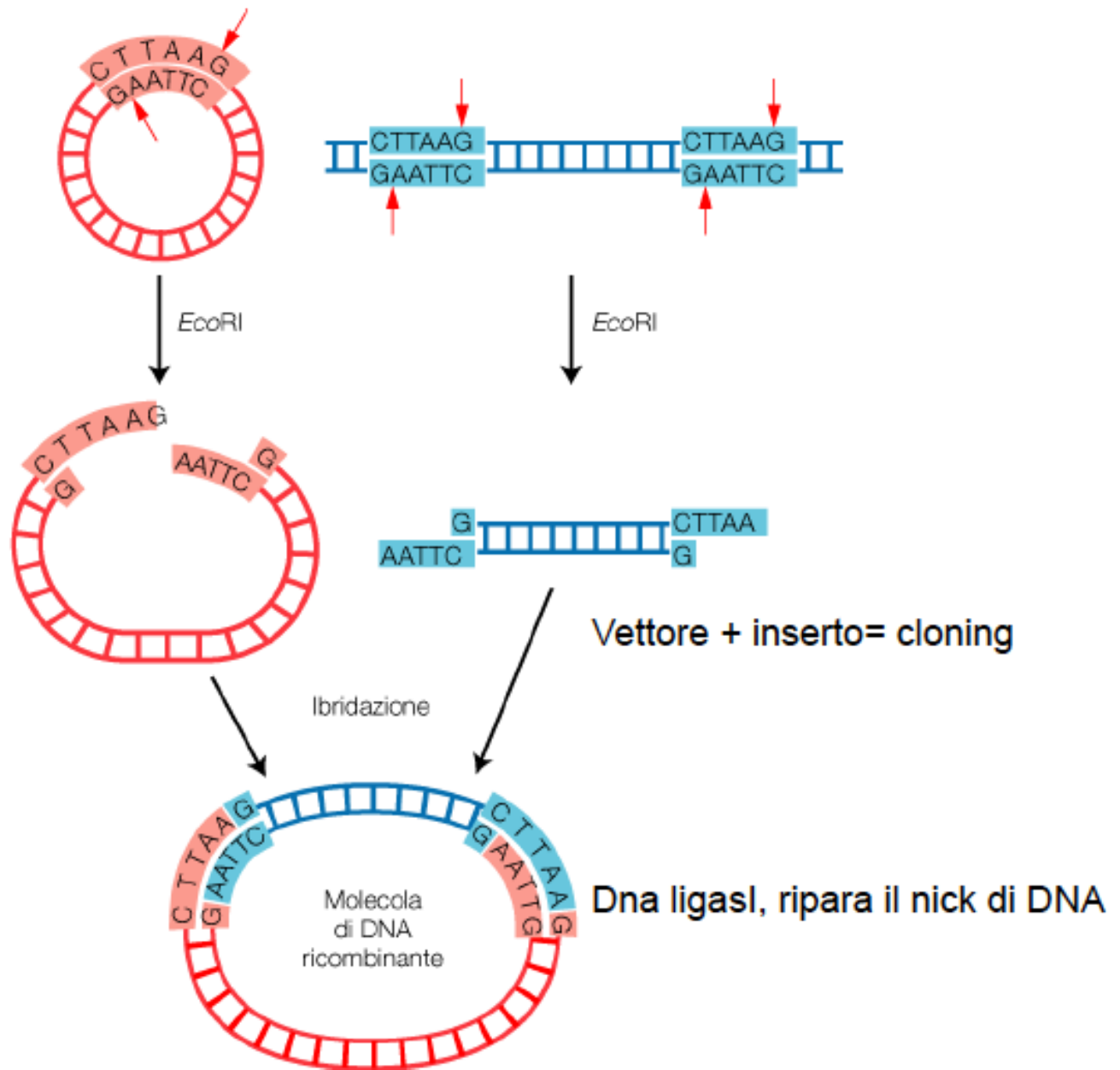
La sequenza di DNA in doppia elica:

5' -NNNNGAATTCNNNN-3'
3' -NNNNCTTAAGNNNN-5'

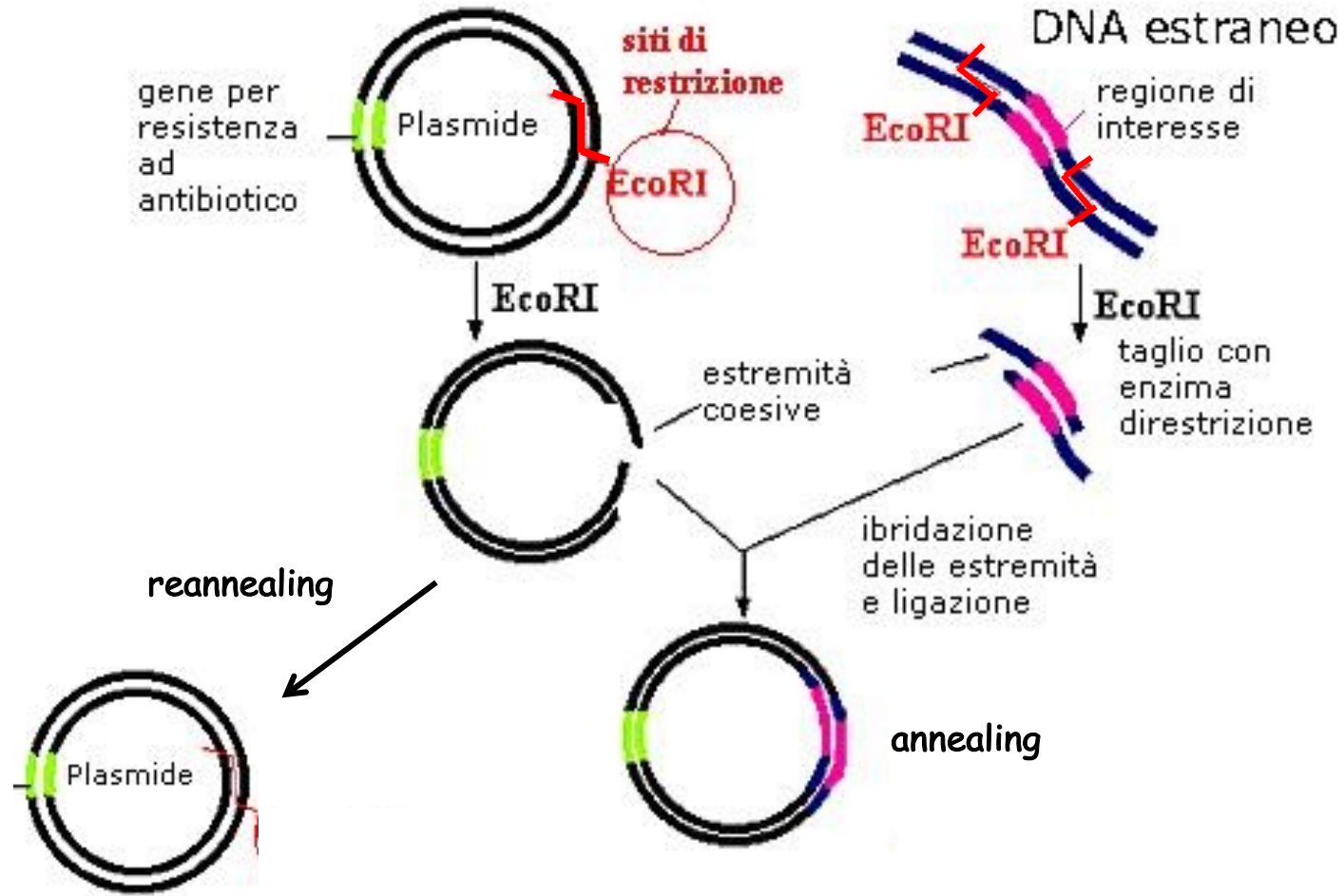
viene tagliata nel seguente modo:

5' -NNNNG pAATTCNNNN-3'
3' -NNNNCTTAAp GNNNN-5'

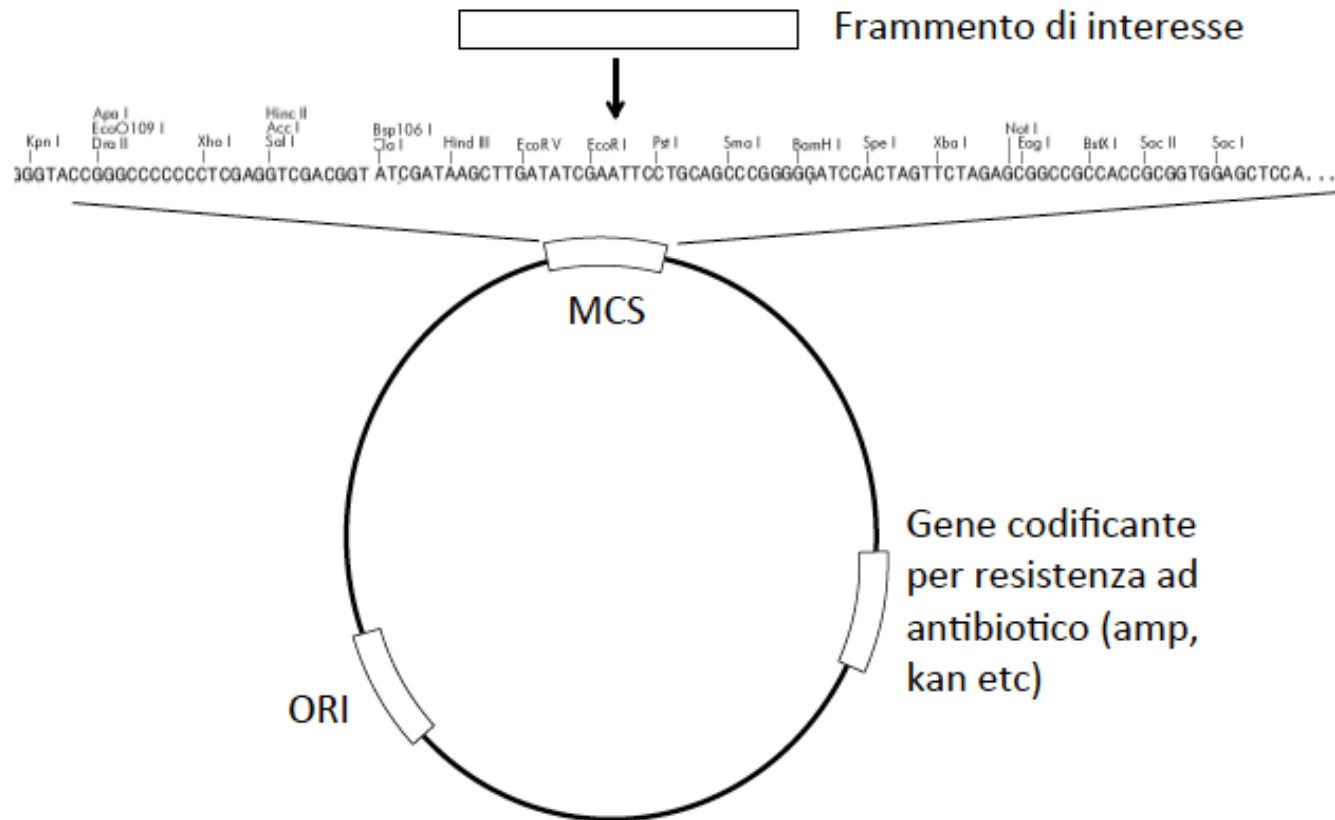
Tutte le estremità generate dagli enzimi che operano un taglio sfalsato, siano esse sporgenti in 5' o in 3', sono "appiccicose", cioè possono formare ponti idrogeno tra le due code a filamento singolo complementari.



Rappresentazione schematica del clonaggio: estremità coesive

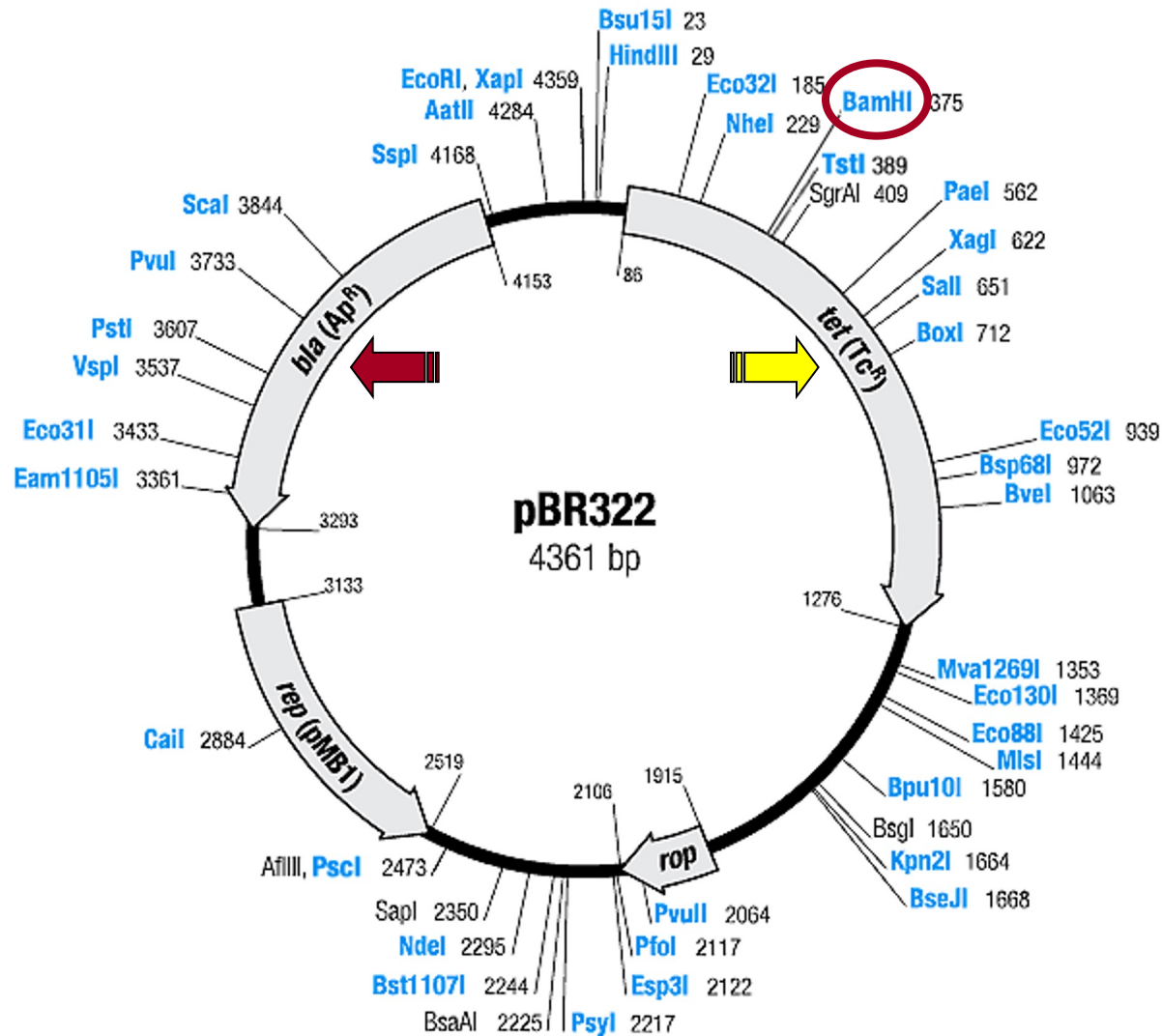


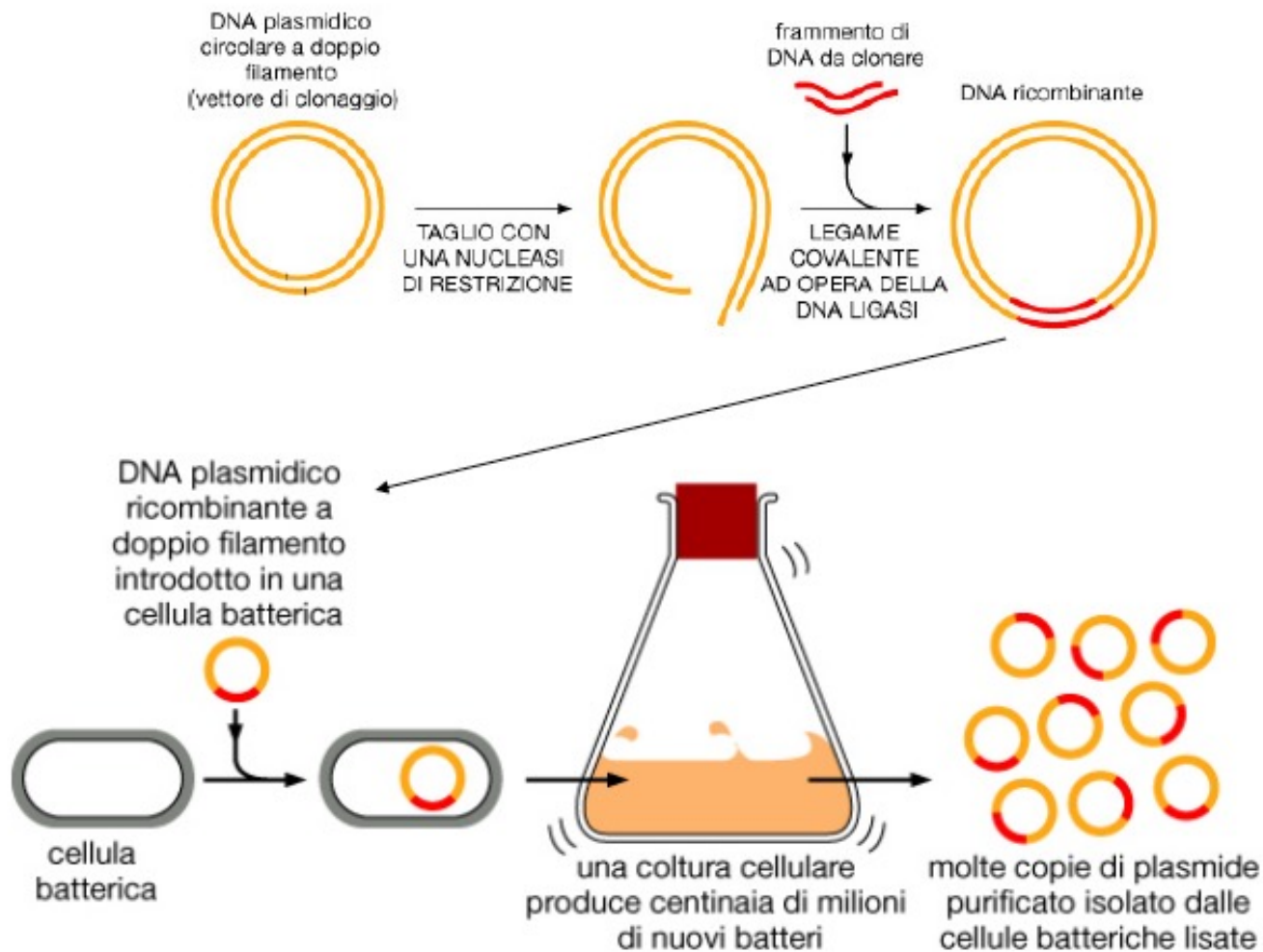
Ovviamente I siti per gli enzimi di restrizione non sono sempre in posizioni compatibili tra inserto e plasmide, quindi I vettori hanno un'altra caratteristica, contengono sequenze con molti siti di restrizione ravvicinati: il **MULTIPLE CLONING SITE (MCS)**



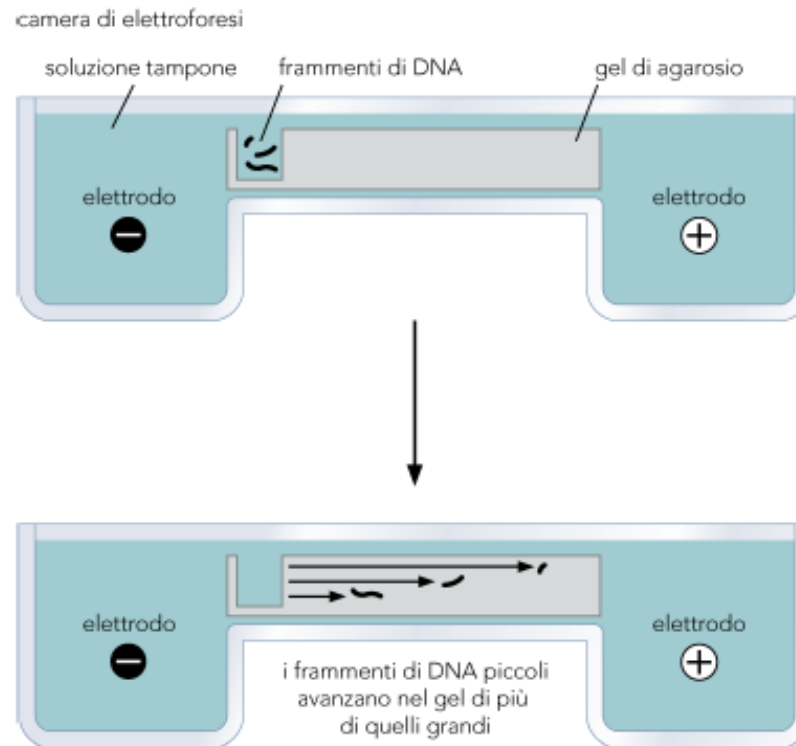
Vettori per il clonaggio

pBR322





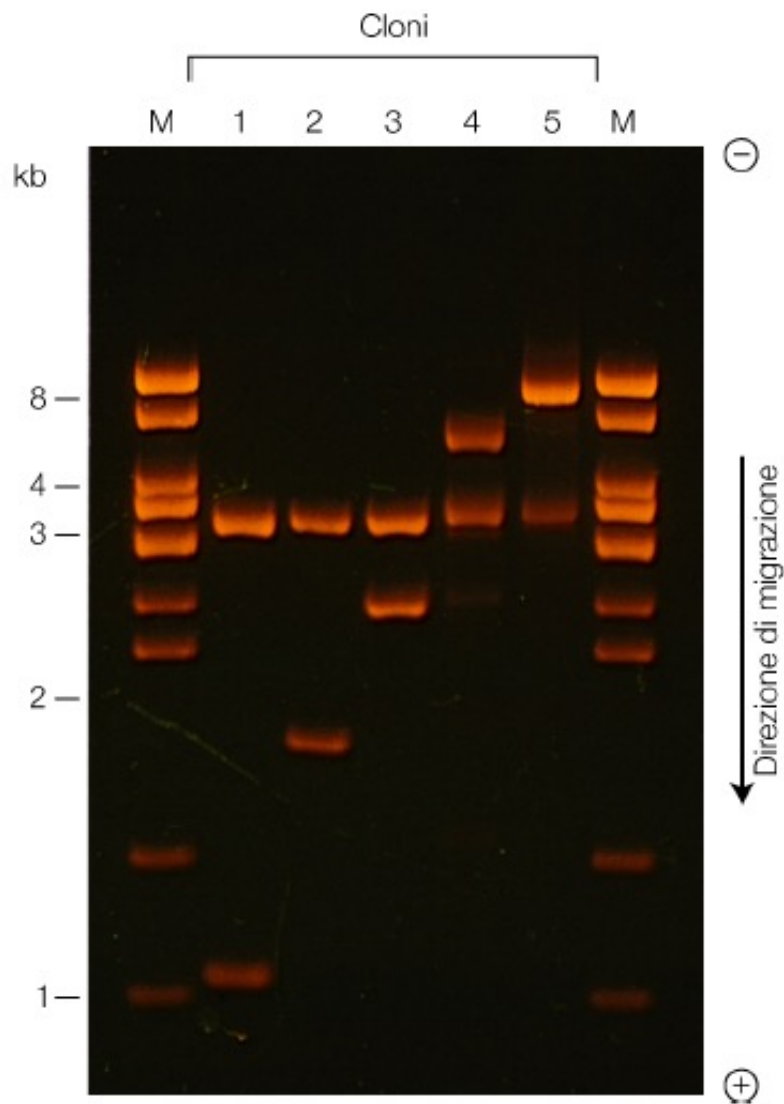
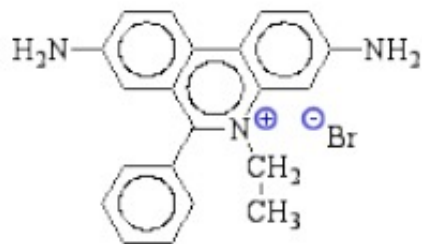
Gel di agarosio



A pH neutro il DNA possiede una carica negativa uniformemente distribuita sulla sua lunghezza.

Perché ?

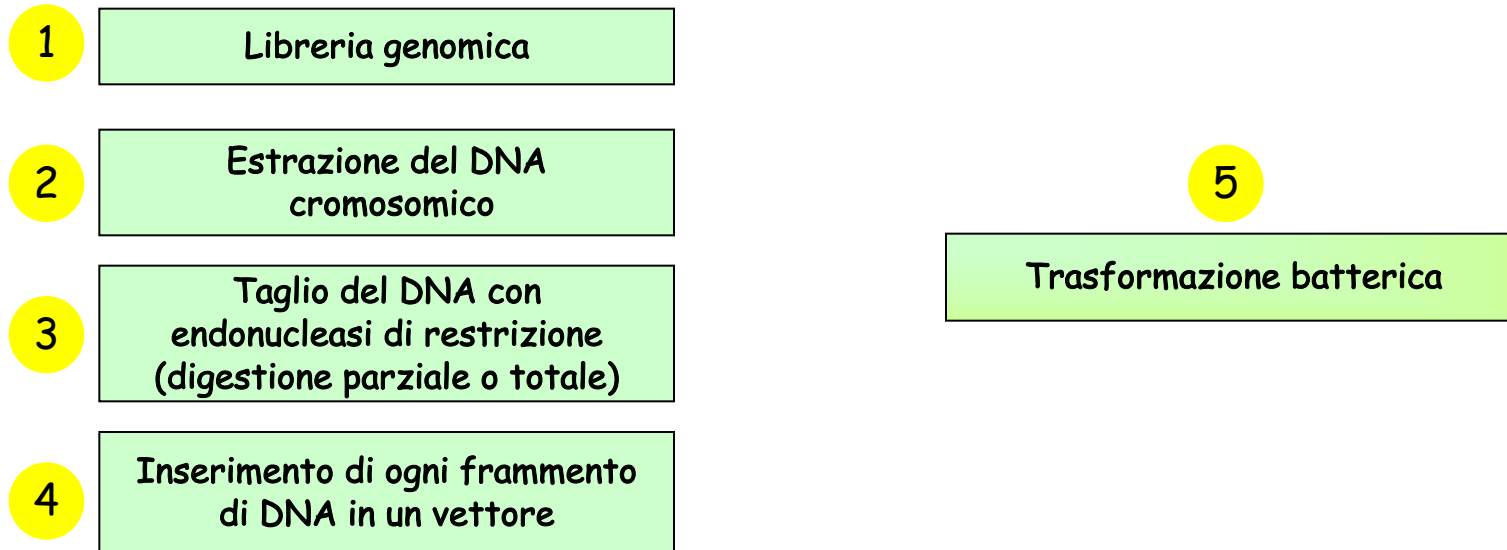
Bromuro D'etidio



...grazie alla scoperta delle *endonucleasi di restrizione*...

Le librerie geniche: collezione di cloni derivante dalla totalità di DNA estratto da un organismo e digerito con un enzima di restrizione:

Le librerie genomiche: composta dalla totalità del DNA cromosomico di un organismo (es: se si vuole studiare l'organizzazione genica);



DNA LIBRARIES

I vettori sono usati per creare delle librerie di DNA a partire dal materiale genetico molti organismi diversi.

Una DNA library e' una raccolta di sequenze di DNA proveniente da un organismo, ciascuna clonata dentro un vettore al fine di permettere la sua purificazione ed analisi

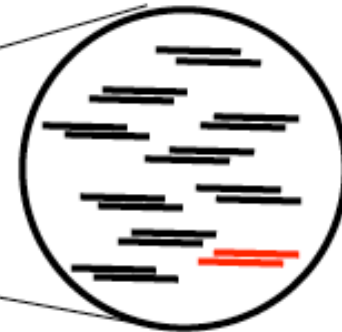
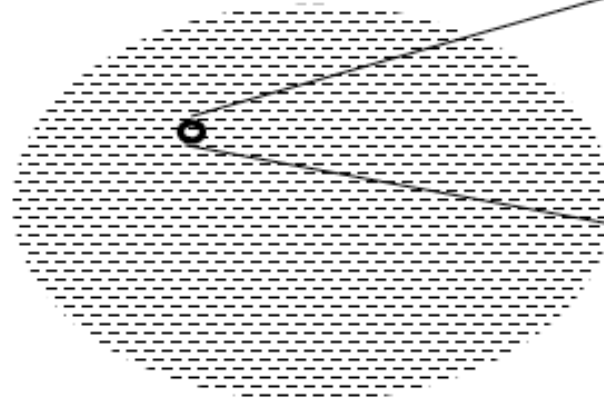
Le DNA libraries possono essere:

1. Genomic libraries: costruite a partire dal DNA genomico
2. cDNA libraries: costruite a partire dall'mRNA

GENOMIC LIBRARIES

Genoma di una cellula: 3×10^9 paia di basi = 1 metro

Taglio con enzimi di restrizione



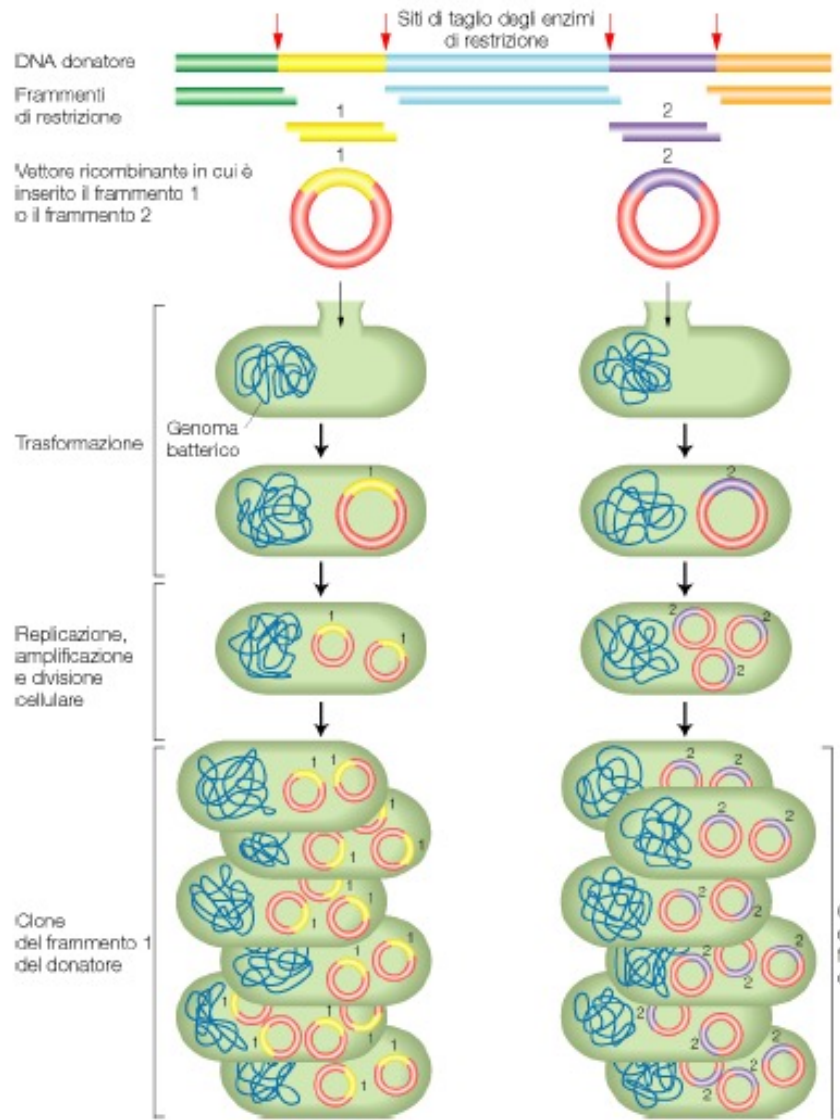
Circa un milione e mezzo di frammenti da 2000 pb

Purificazione dei frammenti della lunghezza desiderata (compatibile col vettore)

Ligazione con un vettore e trasformazione nei batteri



Circa un milione e mezzo di colonie batteriche = banca genica



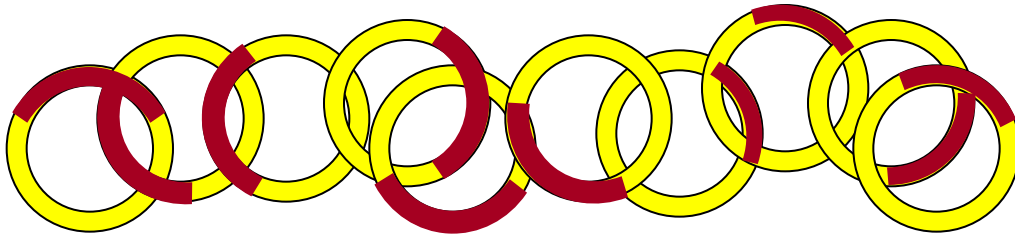
**NB: anche in caso di librerie, rimane la regola:
1 inserto = 1 clone = 1 colonia**

Vettori per il clonaggio (I)

Per clonare una qualsiasi molecola di DNA è necessario inserirla in un vettore per il clonaggio.



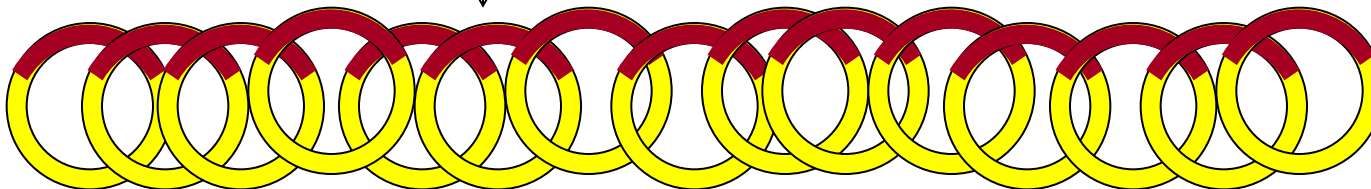
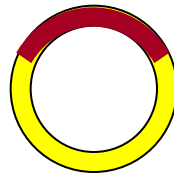
Questi elementi di DNA possono essere mantenuti e propagati in un organismo ospite in cui il vettore possa replicarsi. Un tipico ospite è **Escherichia Coli** che cresce e si divide rapidamente. Qualsiasi vettore con un origine di replicazione adatta si replica con successo in E.Coli (assieme al DNA inserito). Quindi, qualsiasi DNA inserito in un vettore può essere amplificato (se ne possono produrre quantità illimitate) e usato per successive analisi



Libreria genica: ogni vettore contiene un frammento diverso di DNA estraneo

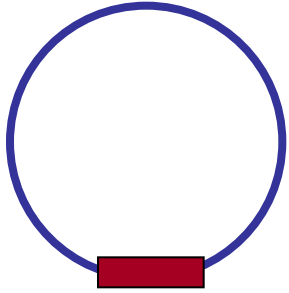


Isolamento di un clone mediante screening della libreria

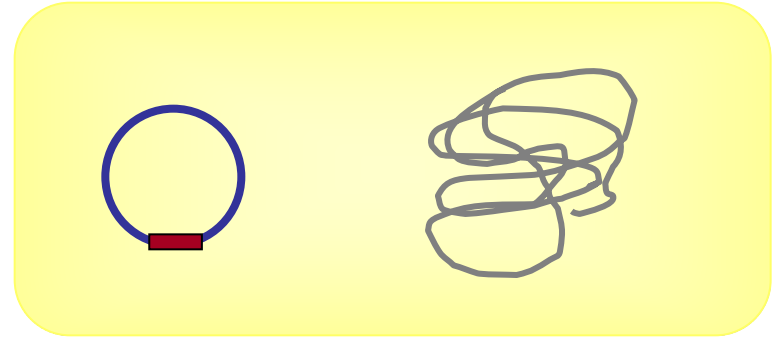


Amplificazione del singolo clone

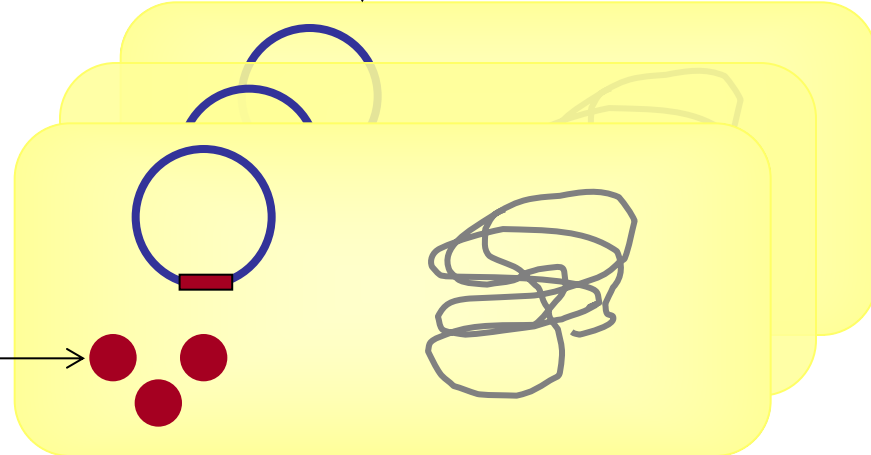
La trasformazione



introduzione del DNA nella
cellula ospite (trasformazione) e
isolamento delle cellule con il gene
clonato



Produzione della
proteina
dal gene clonato



proteina codificata
dal gene clonato



La trasformazione

TRASFORMAZIONE: assunzione di DNA da parte di un organismo

1970: Mandel and Higa osservarono che batteri, trattati con soluzioni di CaCl_2 e riscaldati velocemente, potevano essere trasformati con DNA del batteriofago λ quindi questo trattamento conferiva ai batteri un transiente stato di "competenza"

COMPETENZA: capacità di assumere DNA

Nel corso degli anni sono stati fatti diversi tentativi per migliorare l'efficienza di trasformazione. Le due tecniche maggiormente utilizzate oggi sono:

- ✓ Trasformazione per CaCl_2
- ✓ Elettroporazione

Cosmidi

Possono trasportare 40 kb di DNA clonato e possono essere mantenuti come plasmidi in *E. Coli*.

Vettori di clonaggio

Vector system	Host cell	Insert capacity (kb)
Plasmid	<i>E. coli</i>	0.1-10
Bacteriophage I	<i>E. coli</i>	10-20
Cosmid	<i>E. coli</i>	35-45
Bacteriophage P1	<i>E. coli</i>	80-100
BAC (bacterial artificial chromosome)	<i>E. coli</i>	50-300
P1 bacteriophage-derived AC	<i>E. coli</i>	100-300
YAC	Yeast	100-2,000