

TECNICHE DI GENETICA MOLECOLARE

Tecnologia del DNA ricombinante

Clonaggio del gene di interesse

- Isolamento del gene
- Inserzione in un elemento genetico autoreplicante (vettore di clonaggio: plasmide, cromosoma virale)
- Trasferimento in una cellula ospite

Amplificazione del gene

Un gene clonato può essere utilizzato per la **sintesi di sostanze chimiche di vario interesse**:

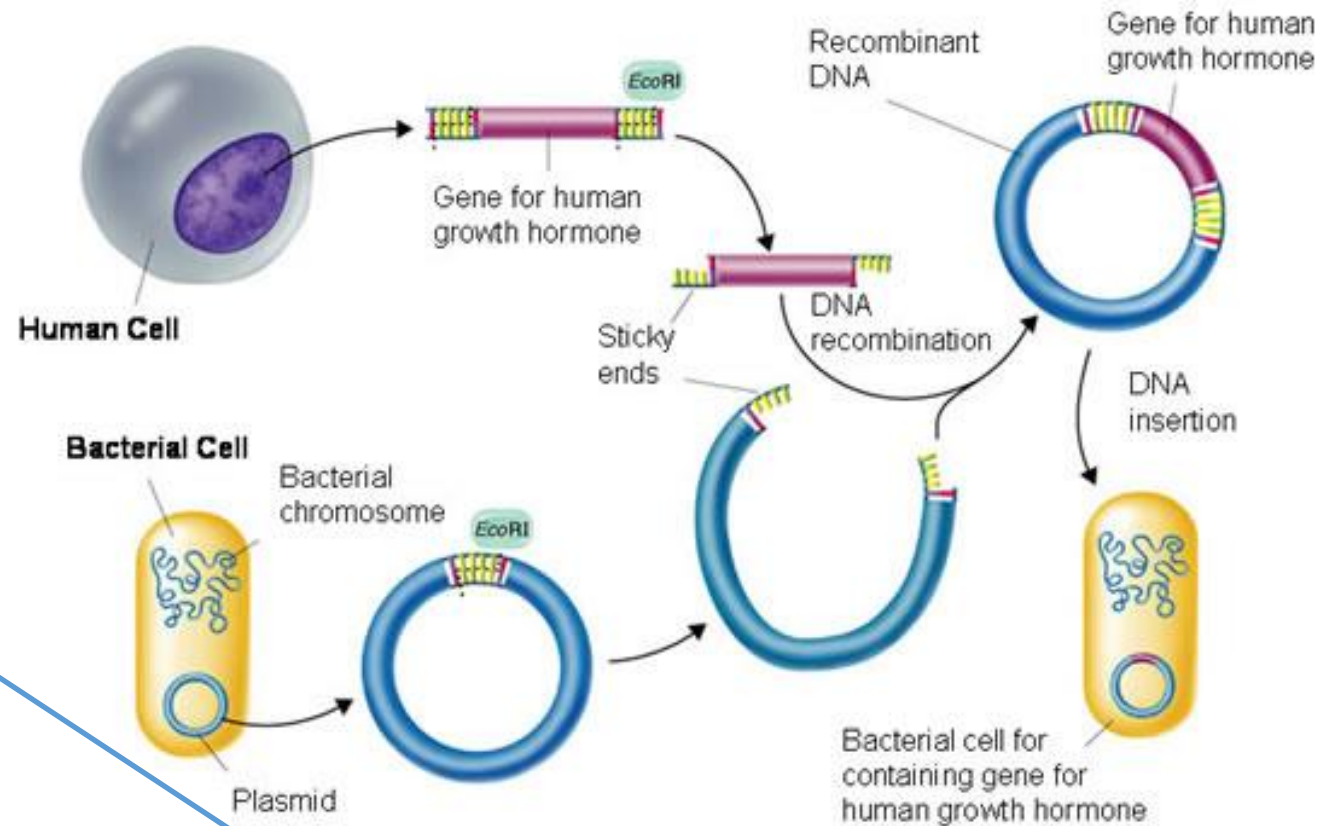
- **Insulina**
- **Ormone della crescita (hGH)**
- ...

Un gene clonato può essere oggetto di **studi struttura-funzione**:

- **Sequenziamento**
- **Confronto con sequenze depositate in banche dati**
- **Confronti con geni simili che presentano sequenze simili**
- ...

Clonaggio

Metodo per **produrre numerose copie di un frammento di DNA**, che può interessare un gene (clonaggio genico) o una sequenza che non codifica geni.



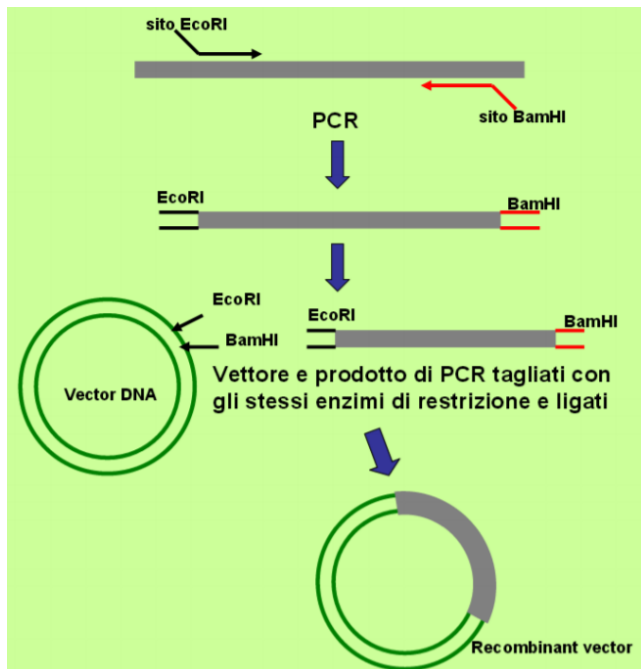
EcoRI
enzima di restrizione con attività endonucleasica isolato da *E. coli*

Per effettuare studi su **geni** o **frammenti di DNA** è necessario che tali sequenze siano disponibili in grande quantità ed in forma pura.

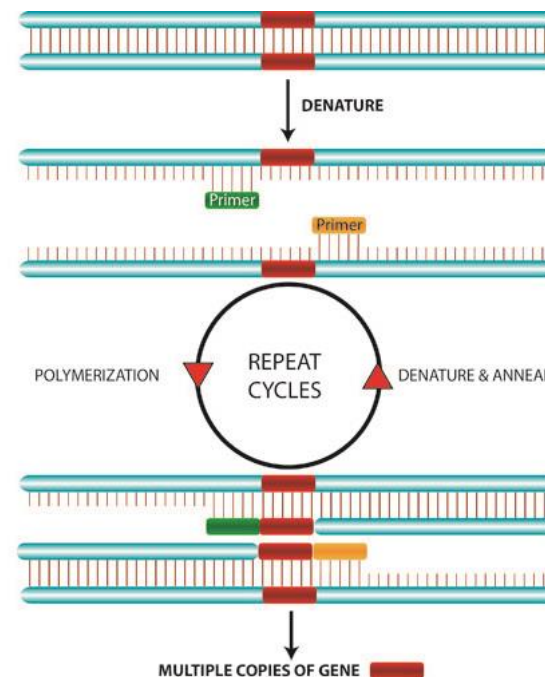
Amplificazione *in vivo* o *in vitro*

Tappe del processo di **amplificazione *in vivo***

- Isolare la sequenza di DNA o il gene di interesse;
- Inserire il gene in un cromosoma autoreplicante (**minicromosoma**);
- Introduzione del minicromosoma in *E. coli* e replicazione del DNA ricombinante (amplificazione).



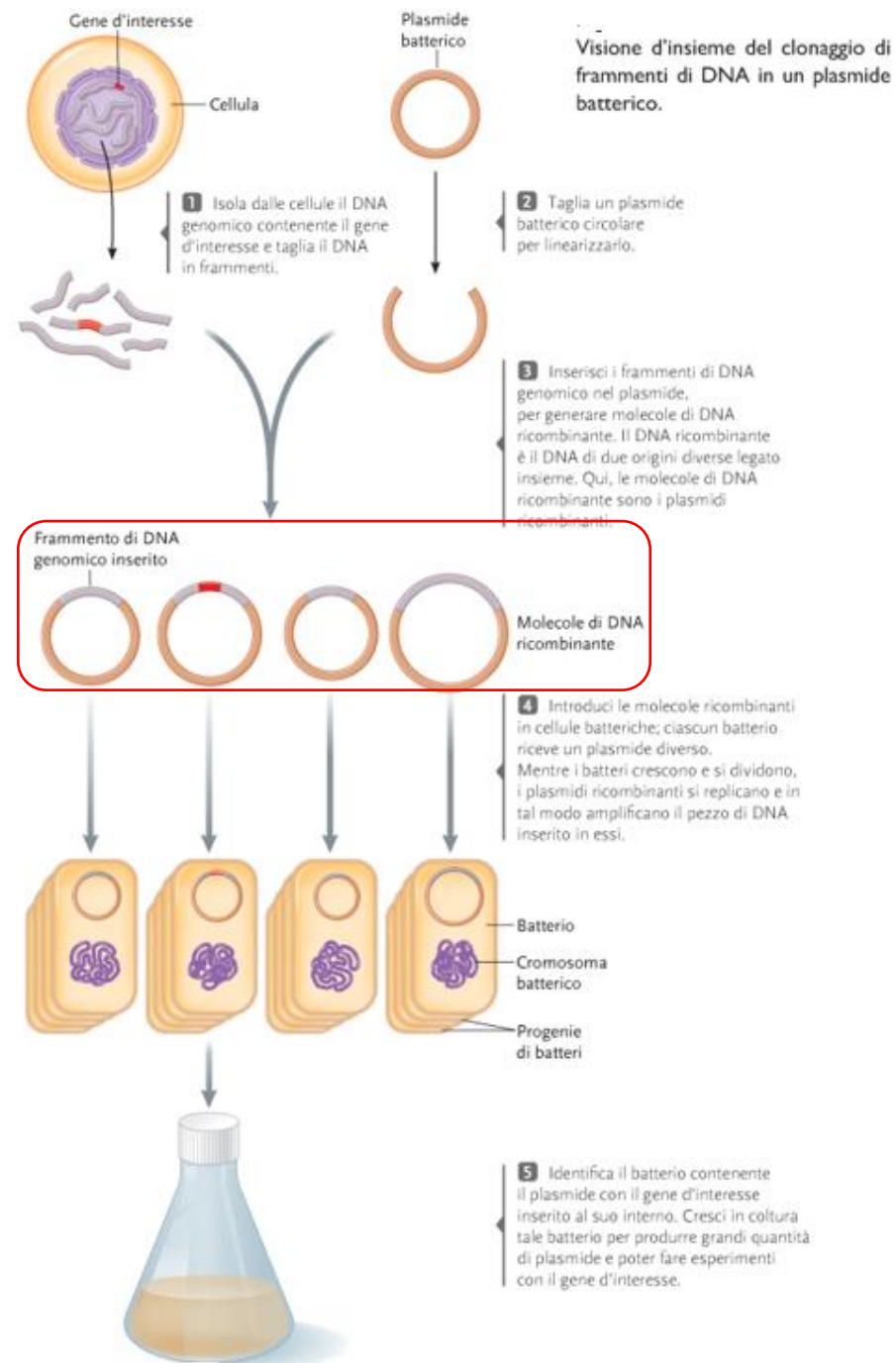
I prodotti della PCR possono essere analizzati (sequenziati) o sottoposti a clonaggio.



Tappe del processo di **amplificazione *in vitro*** → PCR

- Sintesi di brevi filamenti di DNA (**primer**) complementari alle **sequenze fiancheggianti** la sequenza di DNA o il gene di interesse;
- Utilizzo dei primer per consentire alla **DNA polimerasi** di avviare la replicazione (amplificazione) del gene.

La **PCR** (*polymerase chain reaction*) può essere utilizzata solo se si conoscono le sequenze nucleotidiche adiacenti al gene o alla sequenza di interesse!!!



Per poter procedere al clonaggio/sequenziamento sono necessari **enzimi di restrizione (endonucleasi)**

Endonucleasi → tagli casuali all'interno di una catena di DNA.

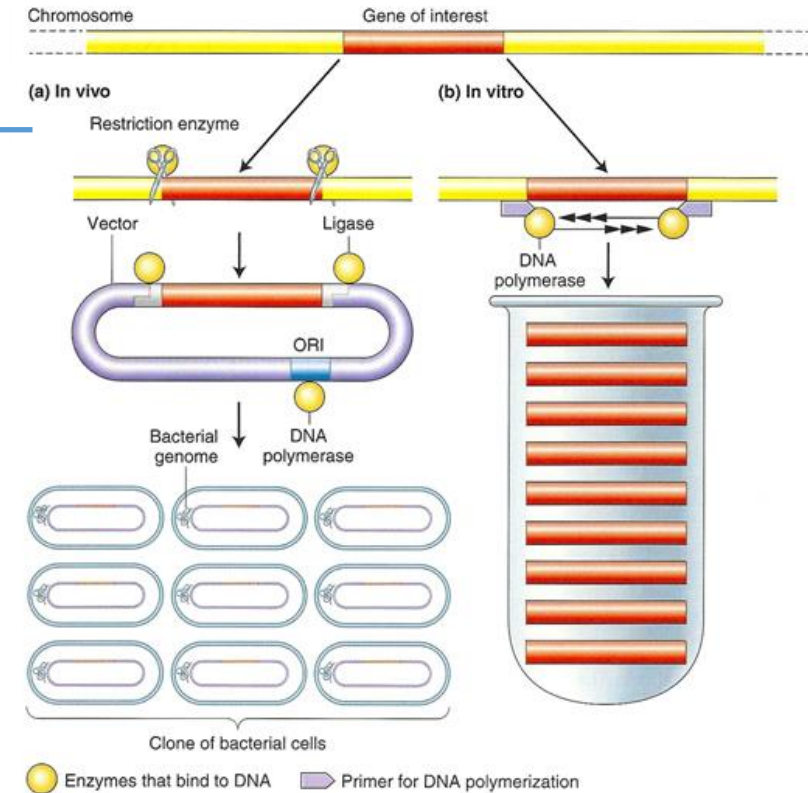
Endonucleasi di restrizione → tagliano il DNA in siti specifici.
Endonucleasi di restrizione Tipo II → tagliano il DNA solo in corrispondenza dei siti di restrizione (indipendentemente dalla specie di provenienza del DNA).

Sequenze di riconoscimento e siti di taglio di alcune tipiche endonucleasi di restrizione				
Enzima	Fonte	Sequenza di riconoscimento ^a e siti di taglio ^b	Numero di sequenze di riconoscimento per cromosoma di	
			Fago λ	Virus SV40
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> ceppo RY13	G [↓] AA [*] TTC CTT AAG [↑]	5	1
<i>HincII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> ceppo R _c	GTPy [↓] PuAC CAPu [↑] PyTG	34	7
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> ceppo R _d	A [↓] AG CTT TTC GAA [↑]	6	6
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	CC [↓] GG GG CC [↑]	750	1
<i>AluI</i>	<i>Artrobacter luteus</i>	AG [↓] CT TC GA [↑]	143	34

^aL'asse di simmetria in ogni sequenza palindromica di riconoscimento è indicato da un punto rosso. Pu indica che l'una o l'altra purina (adenina o guanina) può essere presente in questa posizione; Py indica che può essere presente l'una o l'altra pirimidina (timina o citosina).

^bLa posizione di ogni taglio è indicata da una freccia. Nota che con qualche endonucleasi di restrizione i tagli sono sfalsati (in diverse posizioni sui due filamenti complementari).

Cloning vs. PCR



Funzione biologica endonucleasi di restrizione



Protezione dall'invasione di DNA estraneo (sistema immunitario dei procariori)

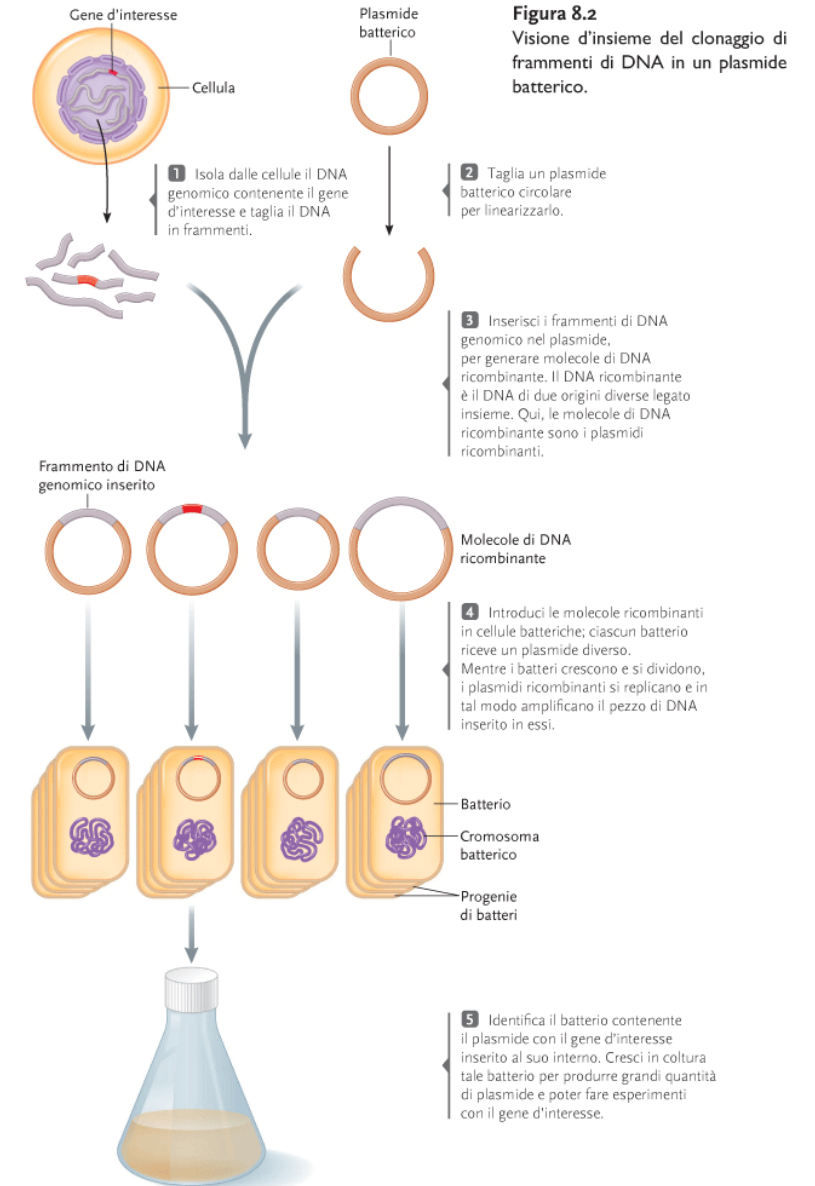
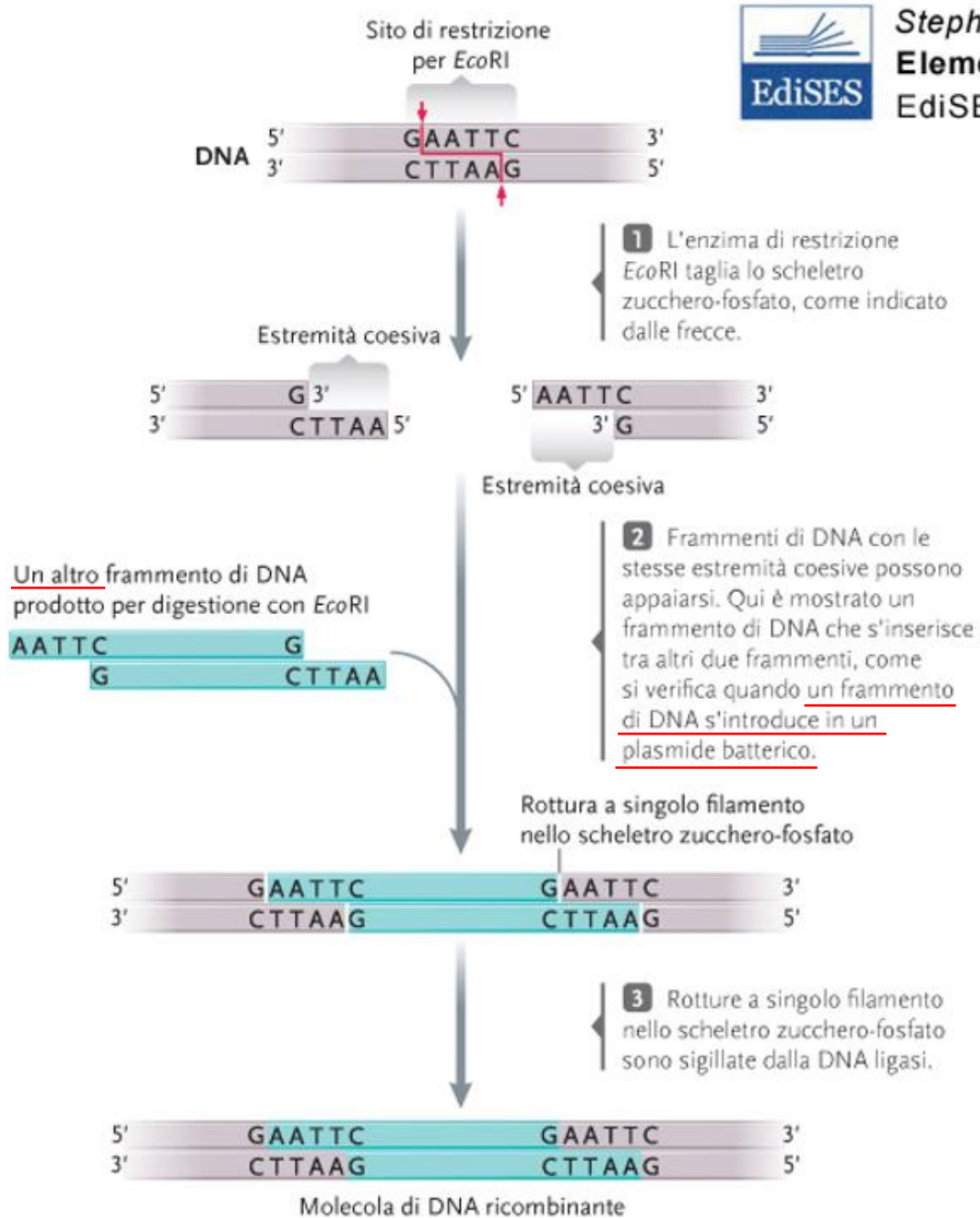


Figura 8.2
Visione d'insieme del clonaggio di frammenti di DNA in un plasmide batterico.

Endonucleasi di restrizione

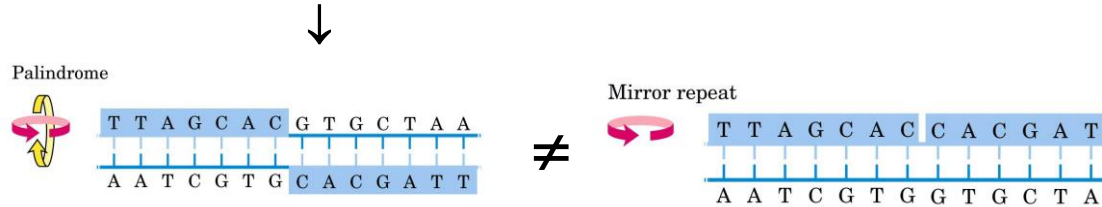
Protezione dall'invasione di DNA estraneo

Subito dopo la replicazione del proprio DNA, le cellule devono proteggere il proprio DNA dall'attacco delle endonucleasi di restrizione.

metilasi sito-specifiche

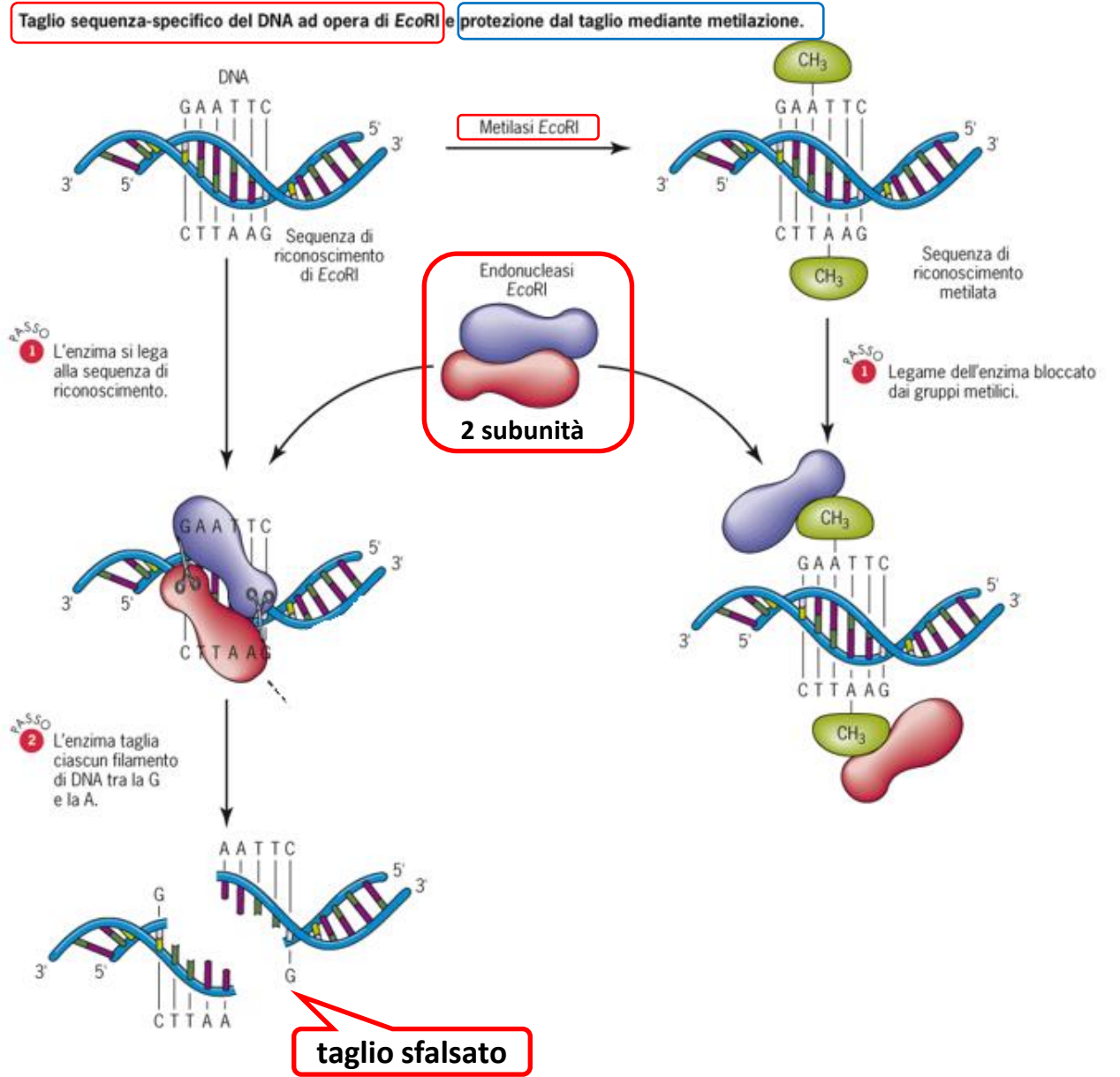
Metilazione di uno o più nucleotidi della sequenza bersaglio.

Le endonucleasi di restrizione, di solito, riconoscono **sequenze palindromi** all'interno del DNA.



Molte endonucleasi di restrizione producono **tagli sfalsati** nei filamenti della doppia elica, generando **frammenti di restrizione** che possono andare incontro a rinaturazione in seguito all'intervento della **DNA ligasi**.

Altre endonucleasi di restrizione tagliano nello stesso punto entrambi i filamenti, generando estremità tronche.



Le **endonucleasi di restrizione** tagliano una specifica sequenza di coppie nucleotidiche, indipendentemente dall'origine del DNA.

Da una miscela di **DNA di diversa origine** si generano **frammenti diversi** che presentano **identiche estremità sfalsate** (complementari).

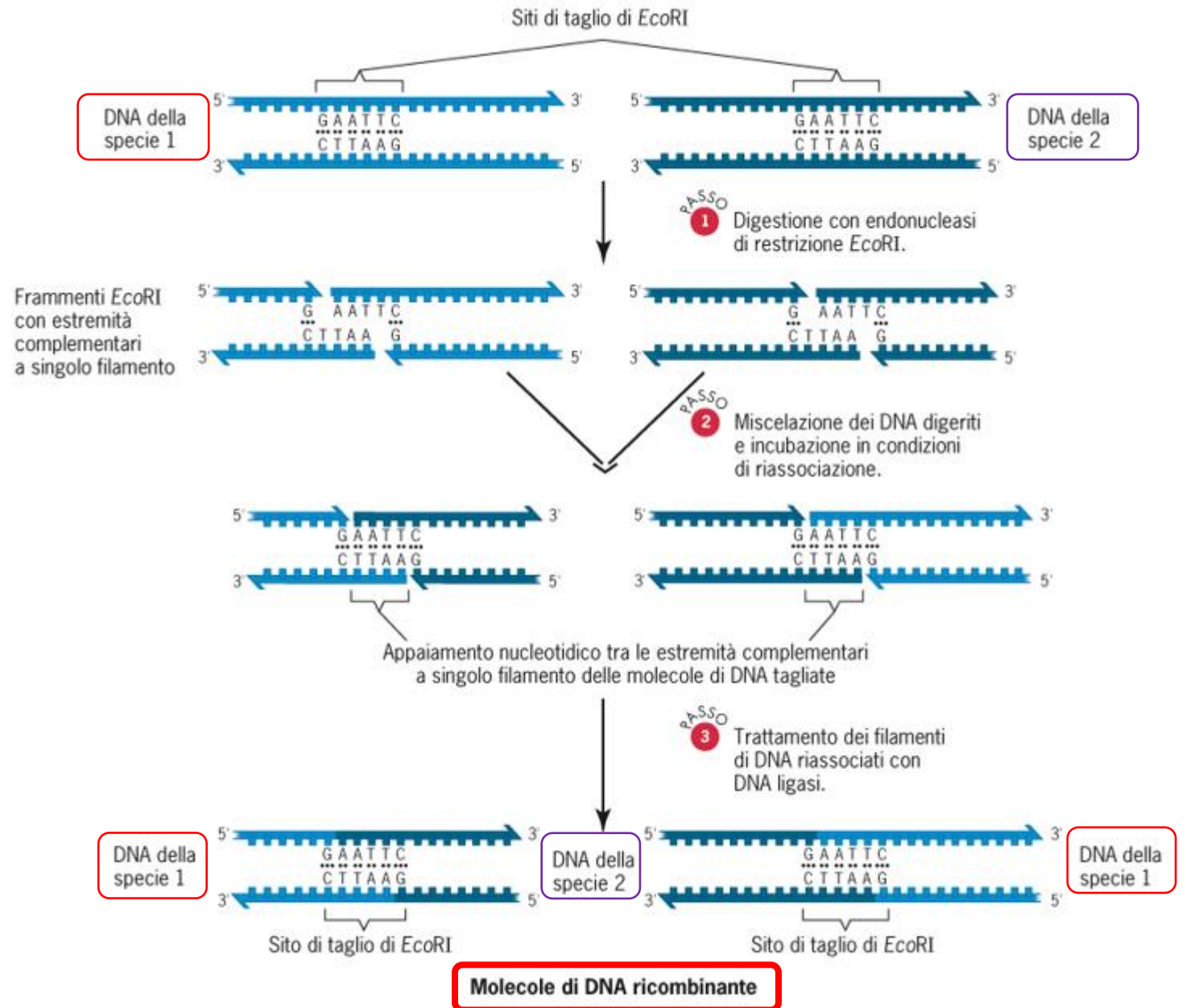
Frammenti di DNA di origine diversa, trattati con lo stesso enzima di restrizione, possono unirsi tra loro.

DNA RICOMBINANTE

Primi esempi di DNA ricombinante

Geni fago λ → DNA circolare del virus SV40

Frammento di restrizione *EcoRI* di una molecola di DNA → plasmide circolare autoreplicante → *E. coli*



Per le diverse applicazioni del DNA ricombinante, dopo aver ottenuto la **molecola ricombinante** è necessario procedere alla produzione del **clone (AMPLIFICAZIONE)**.

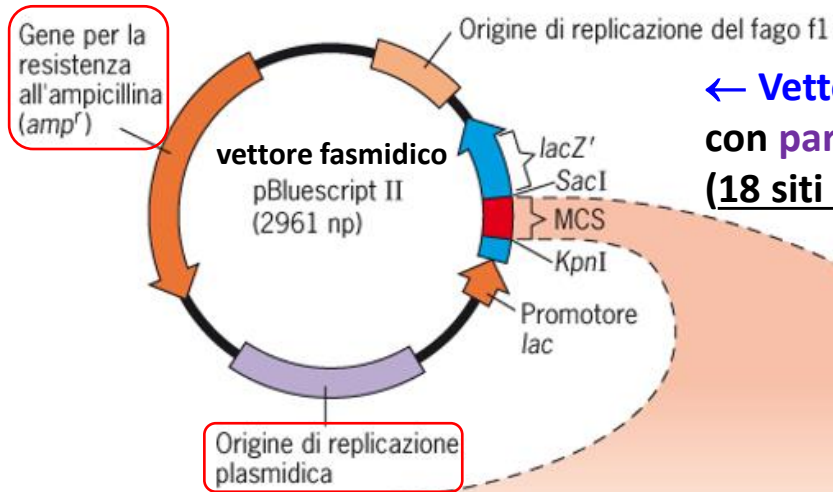
VETTORI DI CLONAGGIO

- Plasmidi
- Cromosomi virali
- ...

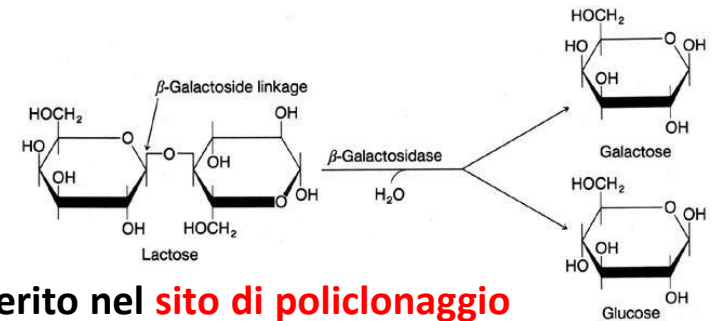
Caratteristiche richieste

- **Origine di replicazione**
- **Marcatore genetico dominante selezionabile (*atb^r*)**
- **Un sito di taglio unico per le endonucleasi di restrizione**

Molto comune è l'uso di vettori di clonaggio contenenti una **sequenza polylinker**, con **più siti di restrizione unici**.



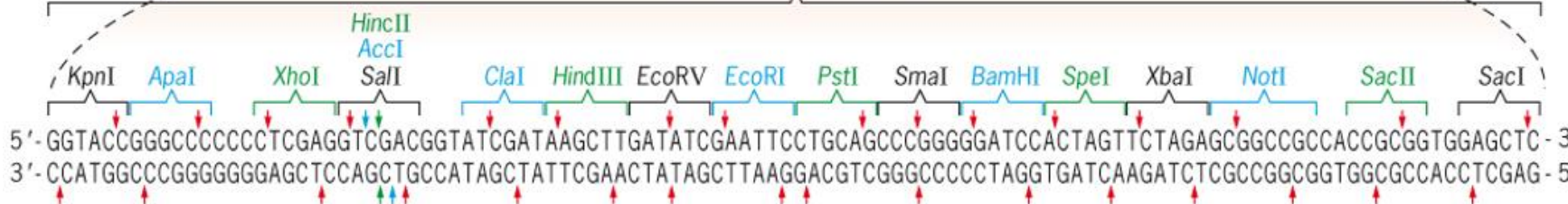
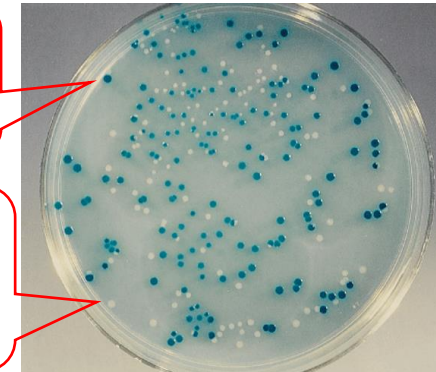
← **Vettore di clonaggio plasmidico Bluescript II con parti di fago M13 e parti di plasmidi (18 siti di restrizione unici)**



Quando del DNA estraneo viene inserito nel **sito di policlonaggio (MCS)**, la funzione (β -galattodidasi) di *LacZ'* viene arrestata.

Le colonie blu sintetizzano β -galattosidasi, che, scindendo **X-gal** (sostanza incolore), genera una sostanza colorata (blu) e galattosio.

Le colonie bianche hanno incorporato DNA estraneo

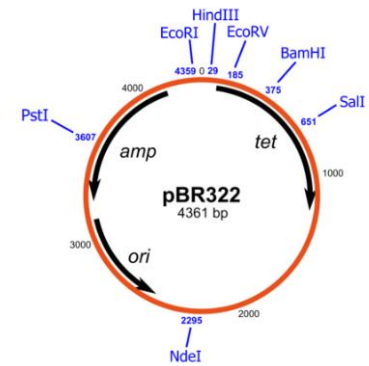


I **plasmidi**, in qualità di vettori, possono ospitare solo **piccole molecole di DNA** estraneo (max 15 kb).

Vettori e dimensioni massime dell'inserto

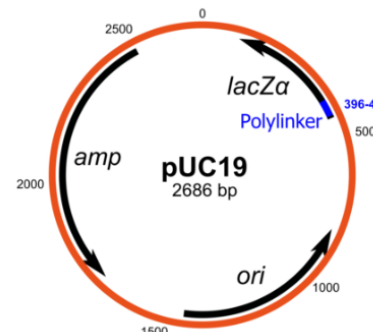
- Plasmidi 15 Kb
- Fasmidi (parti di fago M13 e parti di plasmidi) 15 Kb
- Fago λ 23 Kb
- Cosmidi (plasmidi con estremità coesive del fago λ) 44 Kb
- BAC (cromosoma artificiale batterico) 300 Kb
- PAC (cromosoma artificiale plasmidico) 300 Kb
- YAC (cromosoma artificiale di lievito) 600 Kb

Per il clonaggio di geni o molecole di DNA di grosse dimensioni (fino a 600 Kb) si utilizzano come vettori **BAC, PAC e YAC**.



Plasmidi

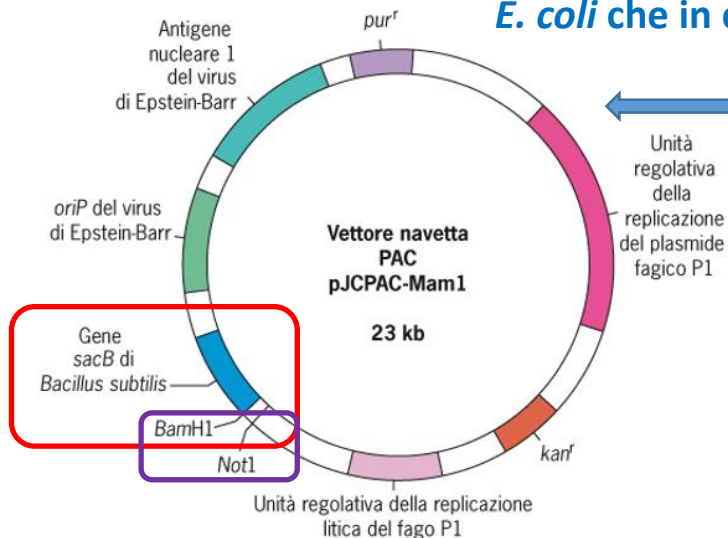
Plasmidi pBR pochi siti di restrizione per il clonaggio



Plasmidi pUC più piccoli e con molti siti di restrizione unici

BAC e PAC si replicano in *E. coli*

PAC (vettore navetta: si replica sia in *E. coli* che in cellule di mammifero)



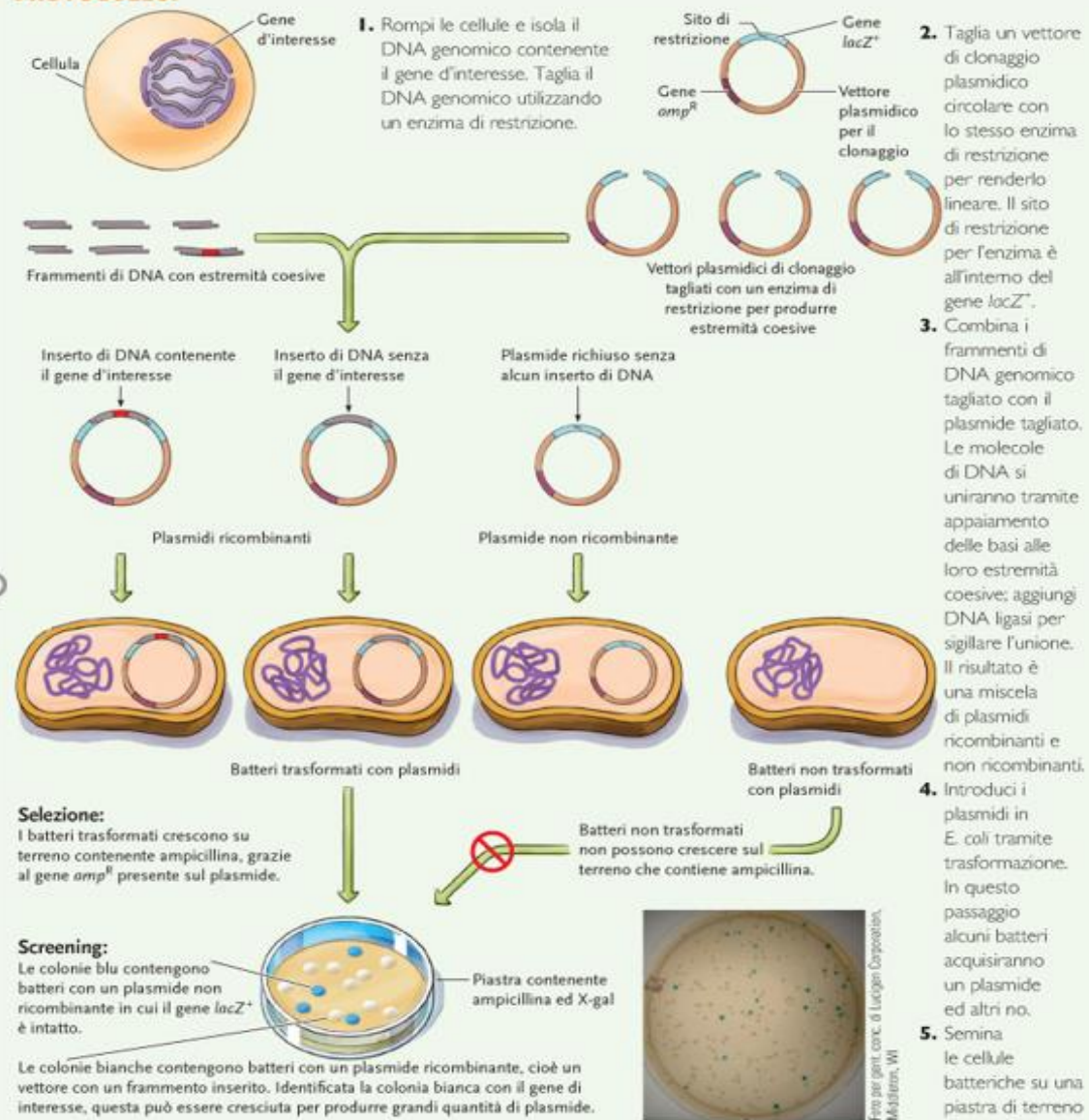
Vettori PAC (cromosoma artificiale plasmidico)

Il gene *sacB* di *B. subtilis* codifica per la levan saccarasi. La presenza della **levan saccarasi è letale per alcune cellule** (produce metaboliti tossici da saccarosio → selezione negativa). In seguito all'inserzione di DNA estraneo, nel sito di inserzione **BamH1**, non viene prodotto l'enzima **levan saccarasi** codificato dal gene *sacB*. Le cellule che riescono a crescere in un terreno di coltura contenente saccarosio al 5% contengono l'inserto di DNA estraneo nel gene *sacB*.

Clonaggio di un gene d'interesse in un vettore plasmidico

SCOPO: Il clonaggio di un gene produce molte copie d'un gene d'interesse, che possono essere utilizzate, per esempio, per determinarne la sequenza di DNA, per manipolare il gene in esperimenti di ricerca di base, per capire la sua funzione e per produrre la proteina codificata dal gene.

PROTOCOLLO:



Possibilità di amplificare sequenze di DNA senza vettori di clonaggio o cellule. **Amplificazione sequenze DNA mediante POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) ← Kary Mullis** Consente di amplificare *in vitro* sequenze di DNA (fino a 35 kb) senza ricorrere a vettori o cellule.

Occorre conoscere brevi sequenze di DNA fiancheggianti la sequenza di interesse, per creare degli inneschi sintetici oligonucleotidici (primer) necessari per avviare l'amplificazione. I **primer** forniscono un'estremità 3'-OH libera per avviare l'attività polimerasica.

Fasi della PCR (ripetute molte volte)

- 1) **Denaturazione** sequenza da amplificare (~ 92-95°C x ~15");
- 2) **Appaiamento primer** (~ 50-60°C x ~30");
- 3) **Replicazione** filamenti di DNA (stampo) mediante DNA polimerasi (~ 70-72°C x ~90").

Le 3 fasi vengono ripetute diverse volte (cicli):

30 cicli di amplificazione → oltre un miliardo di copie della sequenza di DNA (amplificazione esponenziale)

Replicasi

DNA polimerasi I di *E. coli*

Taq polimerasi (*Thermus aquaticus*)

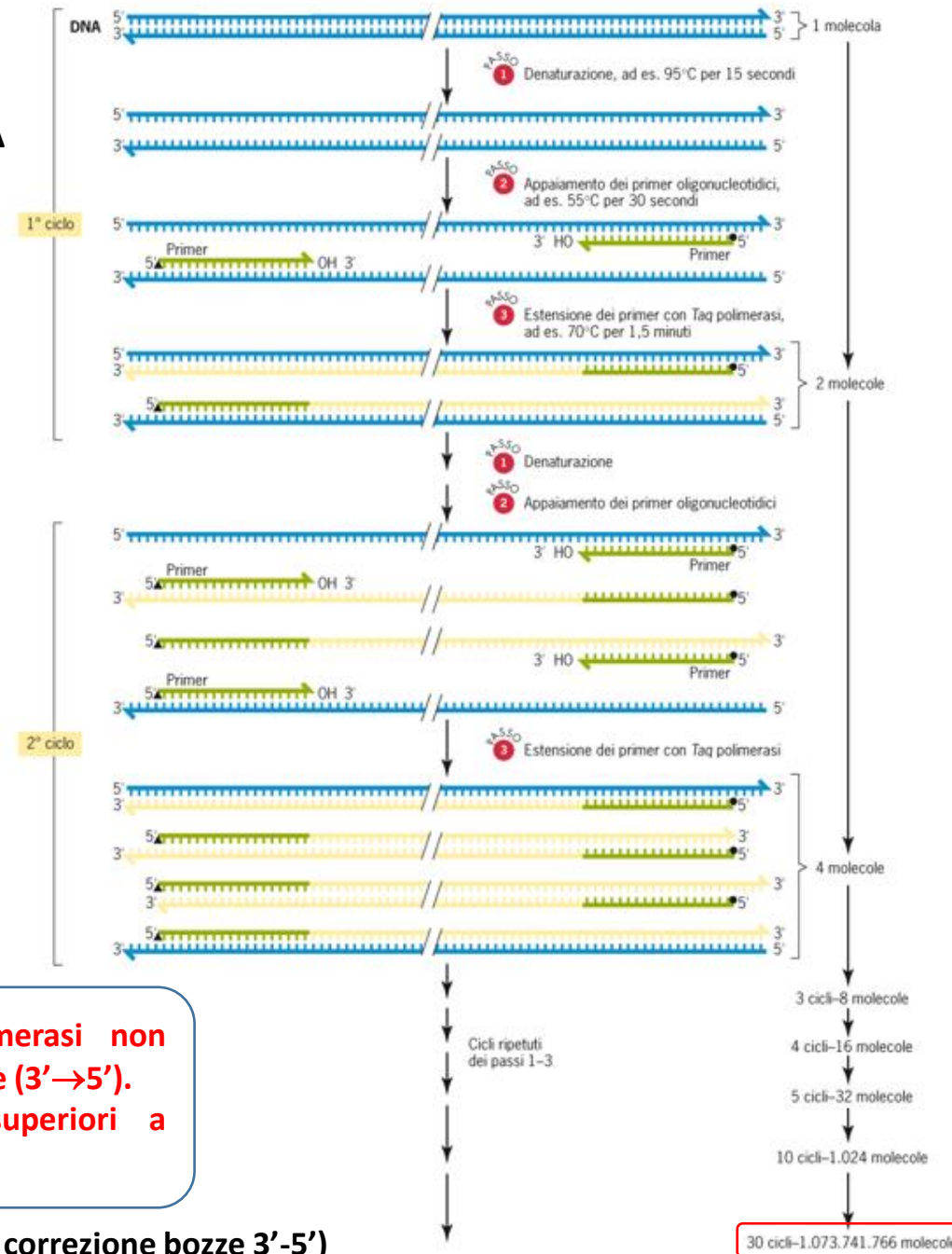
Pfu polimerasi (*Pyrococcus furiosus*)

Tli polimerasi (*Thermococcus litoralis*)

Tfi polimerasi (*Thermus flavus*)

- Possibilità di errori: La **Taq polimerasi non possiede attività di correzione di bozze (3'→5')**.
- **Amplifica corte sequenze (non superiori a qualche migliaio di coppie di basi).**

Replicazione più fedele (hanno attività correzione bozze 3'-5')



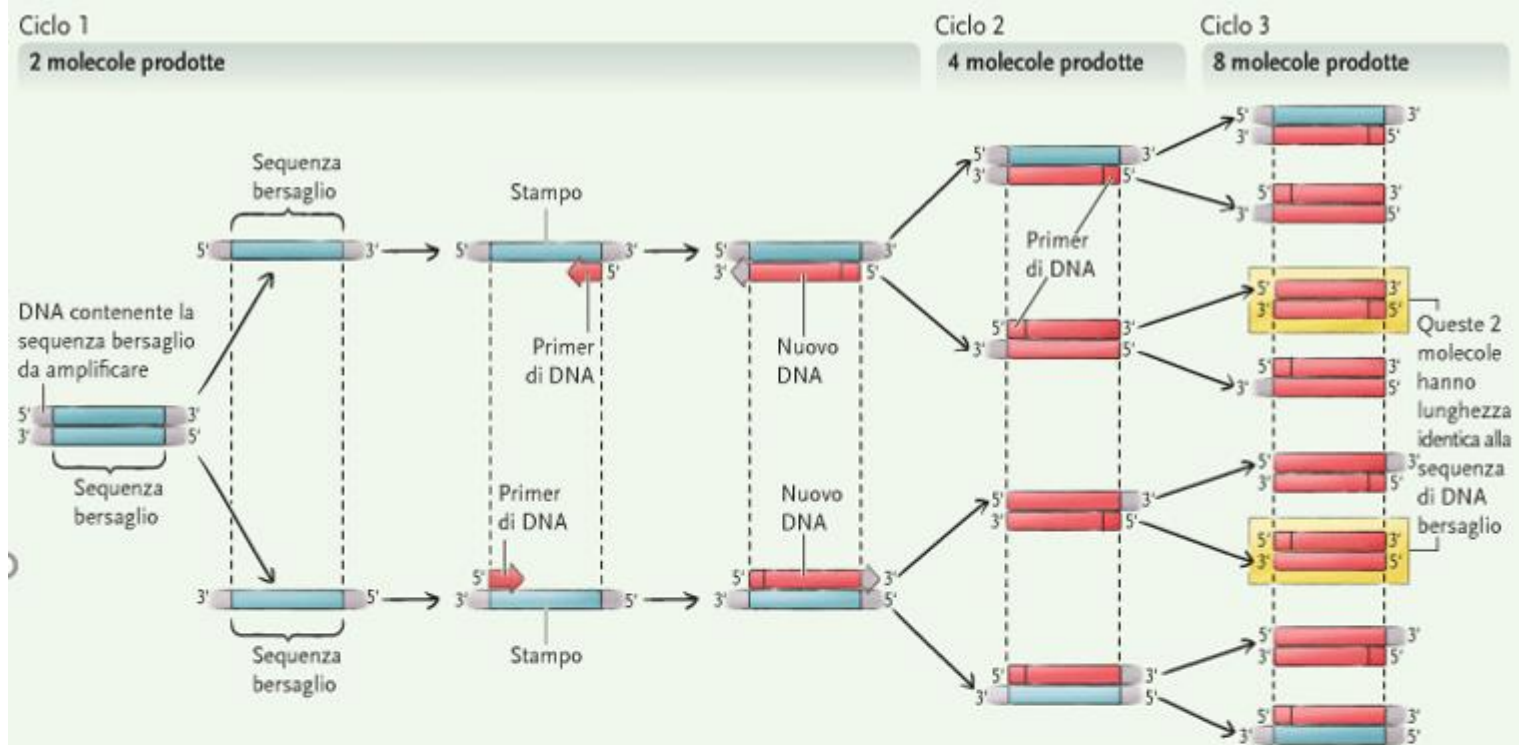
La reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

SCOPO: Amplificare in una provetta una sequenza bersaglio – ossia produrre un grande numero di copie della sequenza **senza clonaggio**.

PROTOCOLLO: Una miscela di reazione di polimerizzazione a catena contiene quattro elementi chiave: **(1)** il DNA con la sequenza bersaglio da amplificare; **(2)** un paio di primer di DNA, ciascuno complementare ad una delle estremità della sequenza bersaglio; **(3)** i quattro nucleotidi trifosfato precursori per la sintesi di DNA (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); **(4)** DNA polimerasi. Poiché la PCR utilizza alte temperature in alcuni dei suoi passaggi, viene utilizzata una DNA polimerasi stabile al calore, tipicamente isolata da un microrganismo che vive ad alte temperature, come vasche termali e bocche vicino al fondo del mare.

Termociclatore

Strumento che conduce automaticamente le fasi cicliche di temperatura per l'amplificazione di sequenze di DNA in vitro.



1. Denaturazione: scalda il DNA contenente la sequenza bersaglio per denaturarlo in singoli filamenti.

2. Appaiamento o annealing: raffredda la miscela per permettere ai primer di appaiarsi alle loro sequenze complementari alle due estremità della sequenza bersaglio.

3. Allungamento: porta alla temperatura ottimale per consentire alla DNA polimerasi di estendere i primer, utilizzando i nucleotidi trifosfato precursori per sintetizzare le copie complementari dei due filamenti stampo. Questo completa un ciclo di PCR; il risultato finale è la produzione di due molecole.

4. Ripeti gli stessi passaggi di denaturazione, appaiamento e allungamento nel ciclo 2, per ottenere 4 molecole.

5. Ripeti gli stessi passaggi, per produrre un totale di 8 molecole. Due delle otto hanno la medesima lunghezza della sequenza di DNA bersaglio (evidenziate in giallo).



Stephen L. Wolfe
Elementi di Genetica
EdiSES

LIBRERIE DNA GENOMICHE

I singoli cromosomi di un organismo possono essere isolati ed utilizzati per generare i diversi cloni.

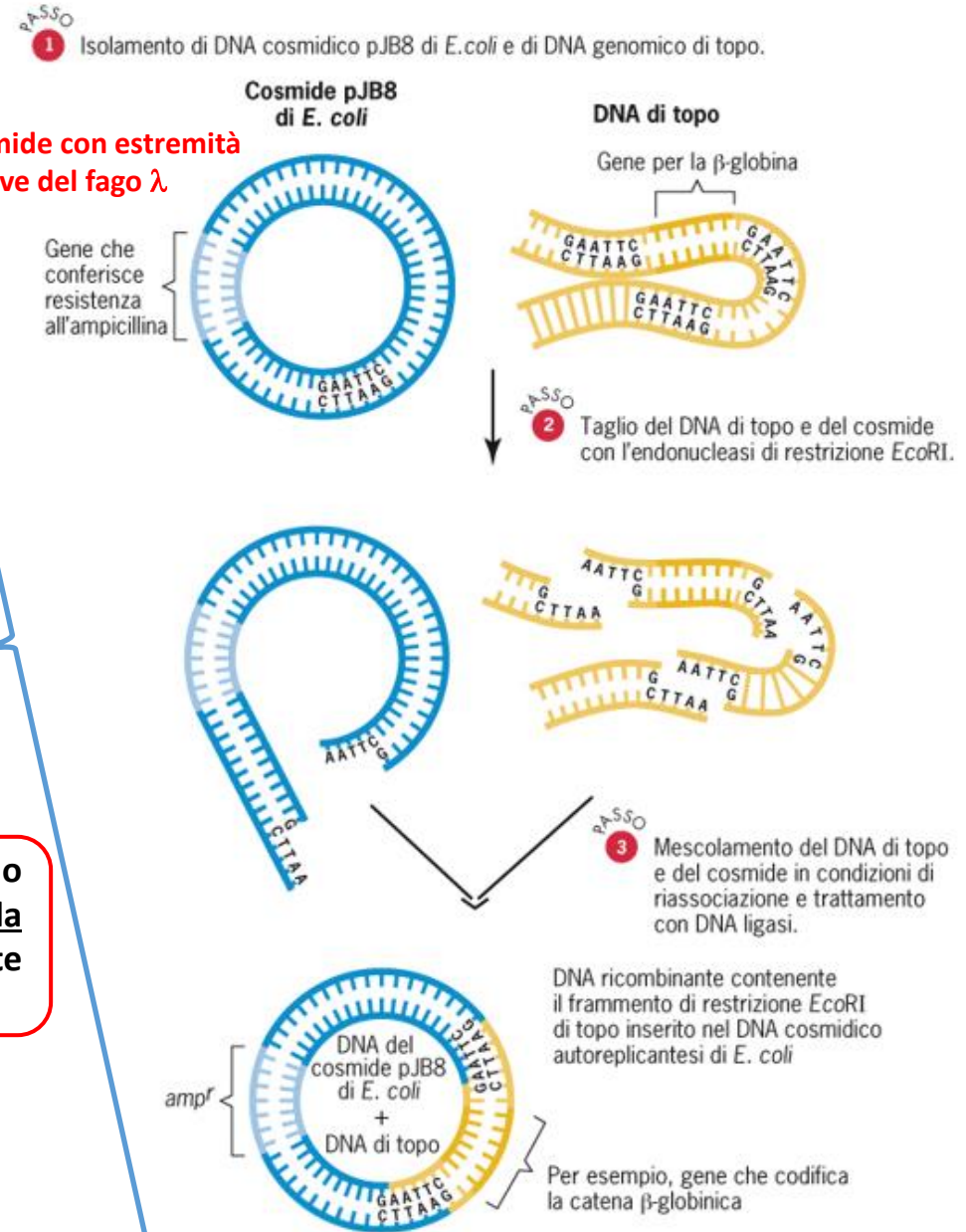
Dopo aver ottenuto i diversi cloni plasmidici, che rappresentano l'intero DNA di un organismo, viene costruita la **libreria genomica (genoteca)**.

Costruzione libreria genomica

- Isolamento del DNA totale di un organismo;
- Trattamento con endonucleasi di restrizione;
- Inserzione frammenti di restrizione in vettori di clonaggio;
- Introduzione delle molecole di DNA ricombinante in cellule ospite sensibili ad un antibiotico (trasformazione);
- Replicazione (amplificazione);
- Selezione cellule trasformate (amp^r).

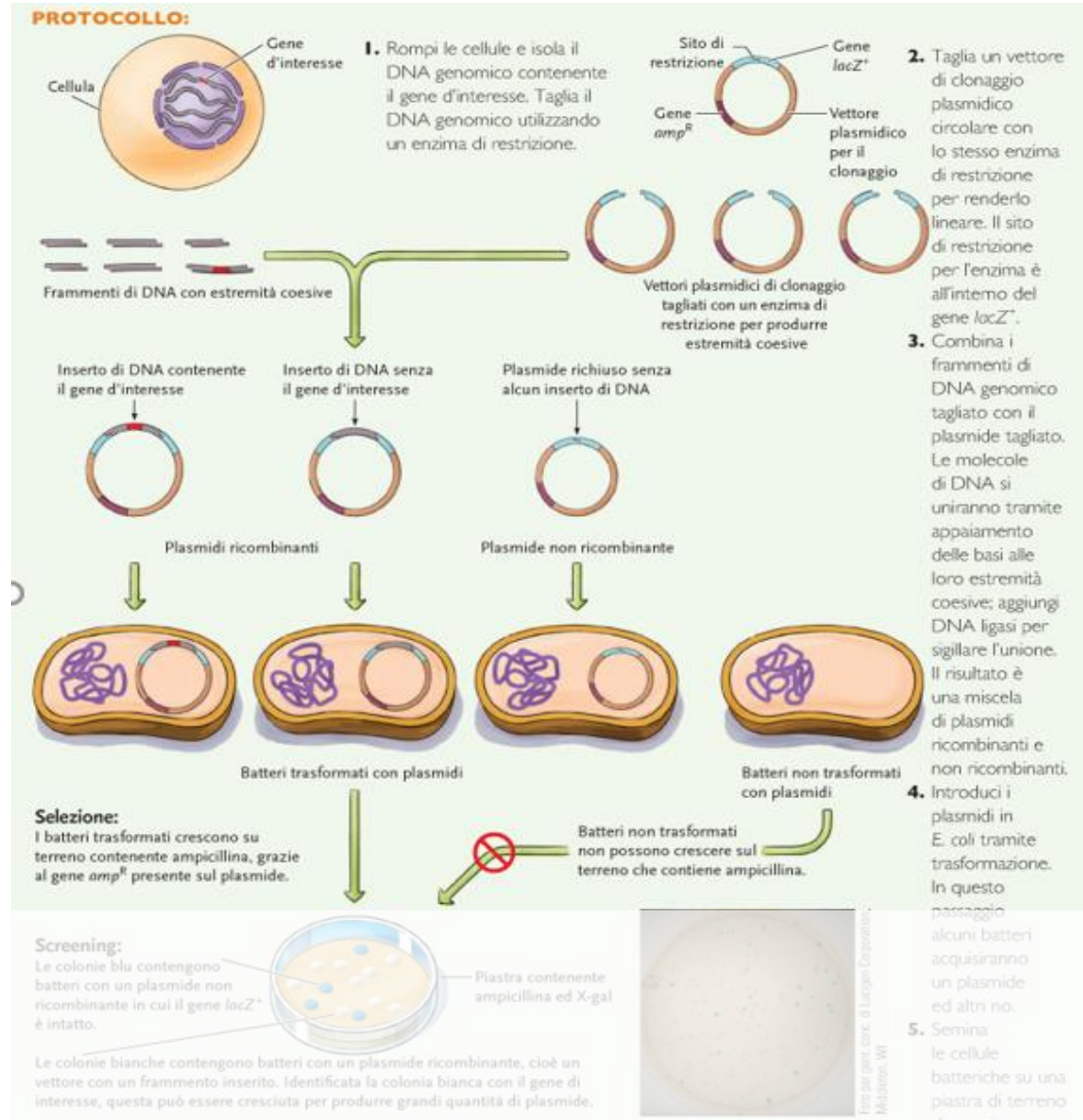
In condizioni che consentono l'ingresso di una singola molecola di DNA ricombinante per cellula.

La libreria genomica dovrebbe contenere tutte le sequenze di DNA del genoma considerato.



Clonaggio di un gene d'interesse in un vettore plasmidico

SCOPO: Il clonaggio di un gene produce molte copie d'un gene d'interesse, che possono essere utilizzate, per esempio, per determinarne la sequenza di DNA, per manipolare il gene in esperimenti di ricerca di base, per capire la sua funzione e per produrre la proteina codificata dal gene.



LIBRERIE cDNA

Nei genomi più evoluti, la maggior parte delle sequenze di DNA non è espressa.



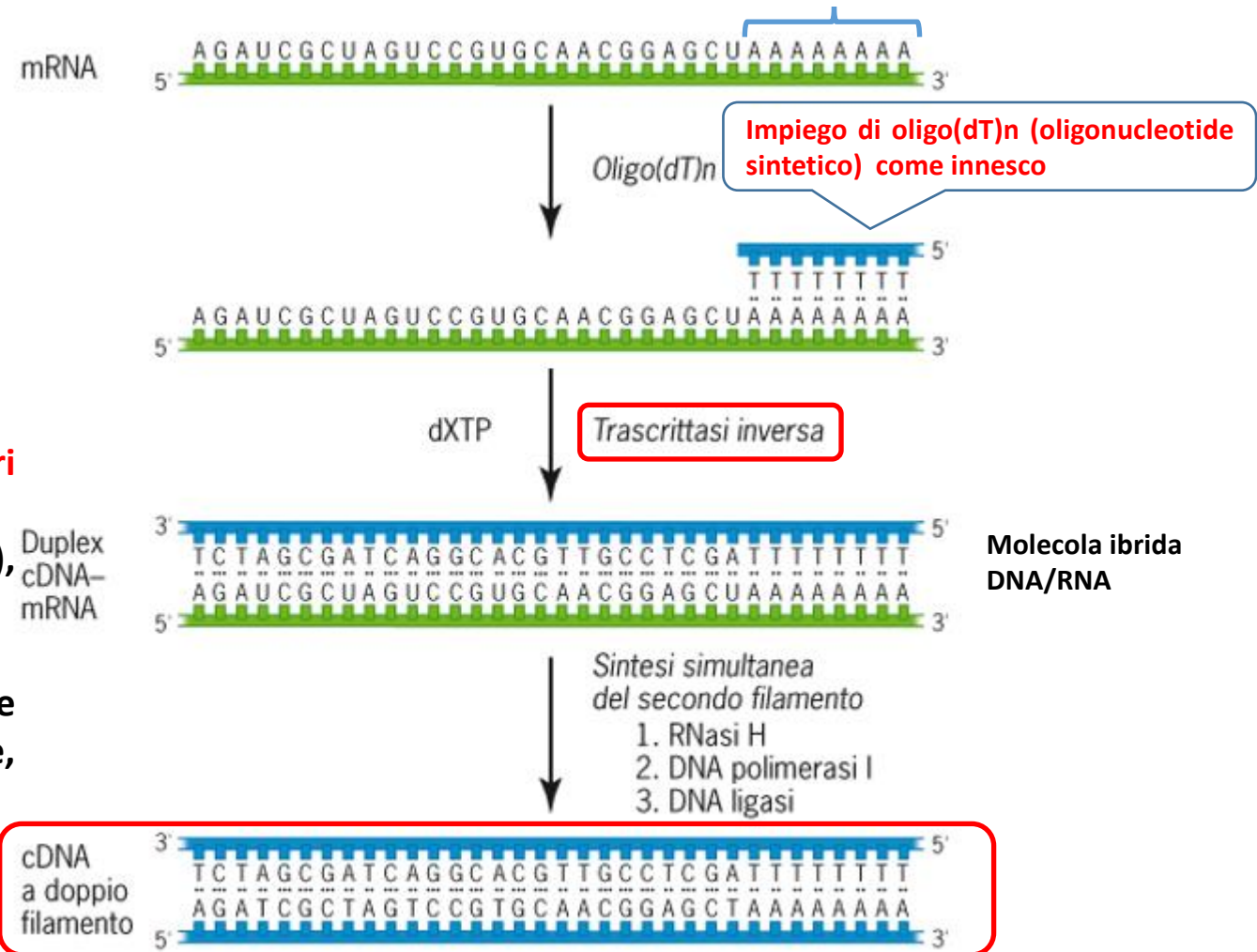
Approcci alternativi al clonaggio.

Se si considerano le molecole di mRNA è possibile risalire alle parti espresse del genoma e procedere alla costruzione di librerie di DNA complementare (cDNA)

- Isolamento mRNA totale da cellule;
- Aggiunta primer a DNA formato da nucleotidi T (dT): **oligomeri poli(T)**;
- Sintesi filamento DNA, complementare all'mRNA (stampo), mediante **trascrittasi inversa**;
- Degradazione filamento mRNA mediante **RNasi H**;
- Sintesi secondo filamento di DNA mediante **DNA polimerasi** che sfrutta i frammenti della molecola di mRNA come innesco e, poi, ne completa la sostituzione.
- Unione delle rotture mediata dalla **DNA ligasi**.

Le molecole di DNA a doppio filamento, possono essere amplificate mediante inserimento in vettori di clonaggio (plasmidi o fagi), dopo aggiunta di siti di restrizione o code a singolo filamento sia al cDNA che ai vettori.

La maggior parte delle molecole di mRNA, all'estremità 3', presenta **code poli(A)**



Tutti i cDNA clonati a partire dagli mRNA cellulari costituiscono la **libreria cDNA**. Per lo **stoccaggio**, i cDNA clonati possono essere trasferiti in micropiastre.

ANALISI LIBRERIA DI DNA PER ISOLAMENTO GENE D'INTERESSE



- Selezione genetica
- Ibridazione molecolare

Selezione genetica o selezione per complementazione

Basata sull'uso di mutanti (mutanti auxotrofi, mutanti resistenti antibiotici, ...)

Selezione genetica

Per esempio, nel caso si voglia procedere all'isolamento (clonazione) del gene per la resistenza alla penicillina in *Salmonella Typhimurium*

- Costruzione di una libreria genomica di *S. Typhimurium* resistente all'antibiotico (→ cloni di DNA ricombinante, tra cui quello contenente il gene per la resistenza).

Quale clone di DNA ricombinante della libreria porta il gene della resistenza?

Individuare quale clone è in grado di trasformare cellule *E. coli* sensibili in **resistenti**.

- Aggiunta dei diversi cloni di *S. Typhimurium* pen^r a diverse colture di *E. coli* pen^s (sensibili).
- Trasferimento cellule *E. coli* in terreno di coltura contenente penicillina.



Solo le cellule trasformate, che contengono il gene pen^r , saranno in grado di crescere in presenza di penicillina.

Selezione per complementazione

Disponendo di organismi mutanti (*E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, ...) portatori di geni mutanti noti, si può individuare quale, tra i cloni ottenuti da un altro organismo contenente l'allele selvatico, è quello in grado di ripristinare il fenotipo selvatico.



Cloni di cDNA di lievito possono essere utilizzati per capire quale di essi è in grado di trasformare cellule di *E. coli* auxotrofe per l'istidina in cellule prototrofe.

Cloni di cDNA + colture *E. coli* his^- → colture *E. coli* his^+

A causa dei diversi sistemi di regolazione dell'espressione genica tra procarioti ed eucarioti, spesso, per l'analisi di librerie di DNA di organismi eucariotici si ricorre all'uso di cellule di *Saccharomyces cerevisiae*.

ANALISI LIBRERIA DI DNA PER ISOLAMENTO GENE D'INTERESSE

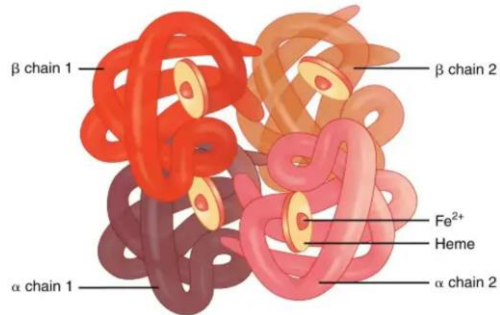
- Selezione genetica
- Ibridazione molecolare

Primi geni clonati (geni espressi ad alti livelli)

α -globina ← reticulociti

β -globina ← reticulociti

ovoalbumina ← cellule ovidotto pollo



Creazione sonda marcata specifica per la ricerca del gene di interesse (es, gene α -globina)

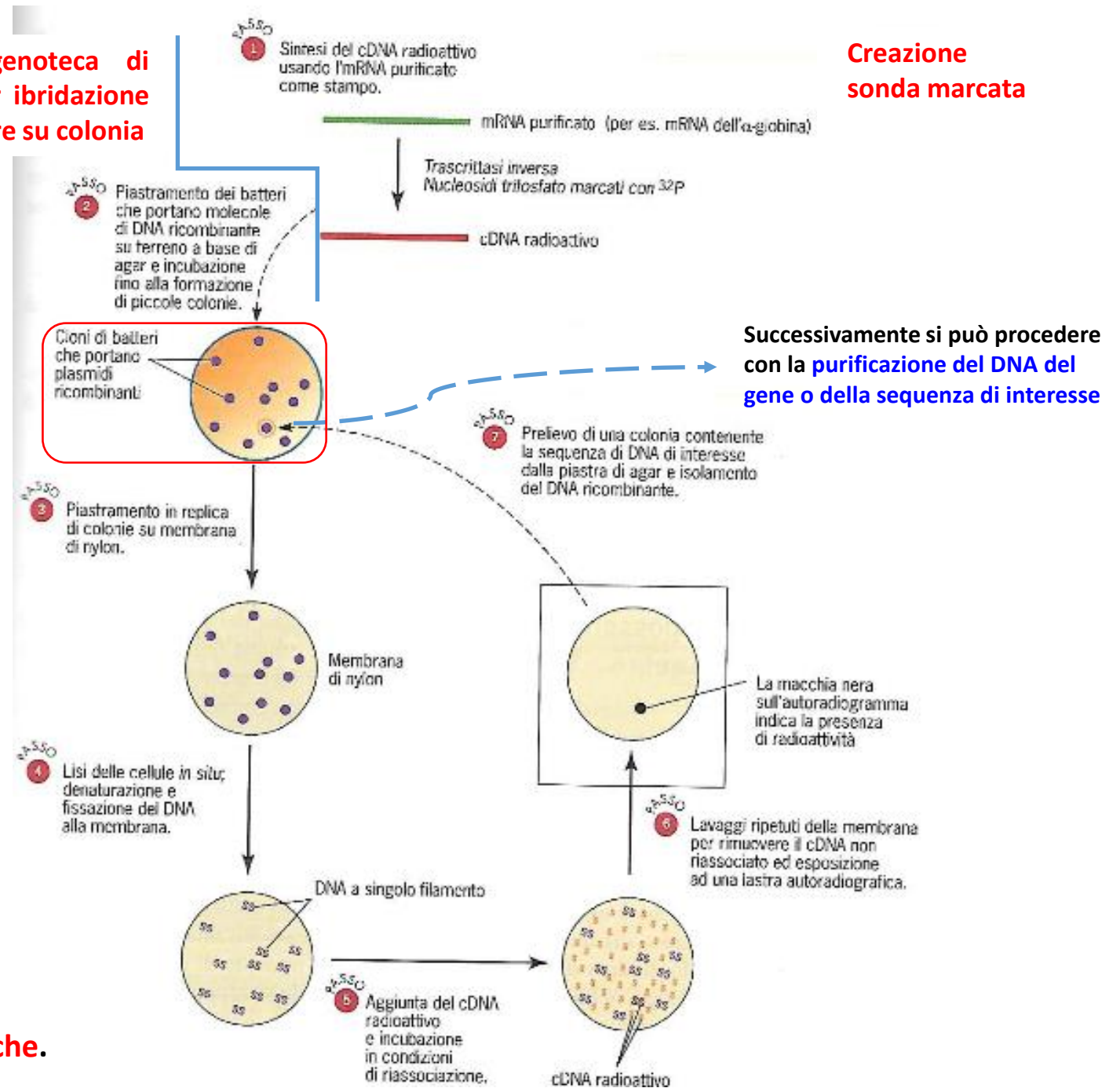
isolamento mRNA

Sintesi cDNA marcato (^{32}P)
(mediante trascrittasi inversa)

Analisi di librerie di cDNA mediante la

tecnica di ibridazione *in situ* su colonie o su placche.

Analisi genoteca di DNA per ibridazione molecolare su colonia



Creazione sonda marcata

ANALISI LIBRERIA DI DNA PER ISOLAMENTO GENE D'INTERESSE

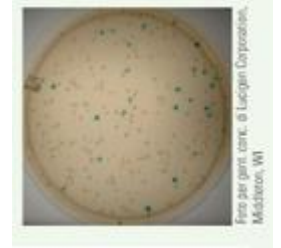
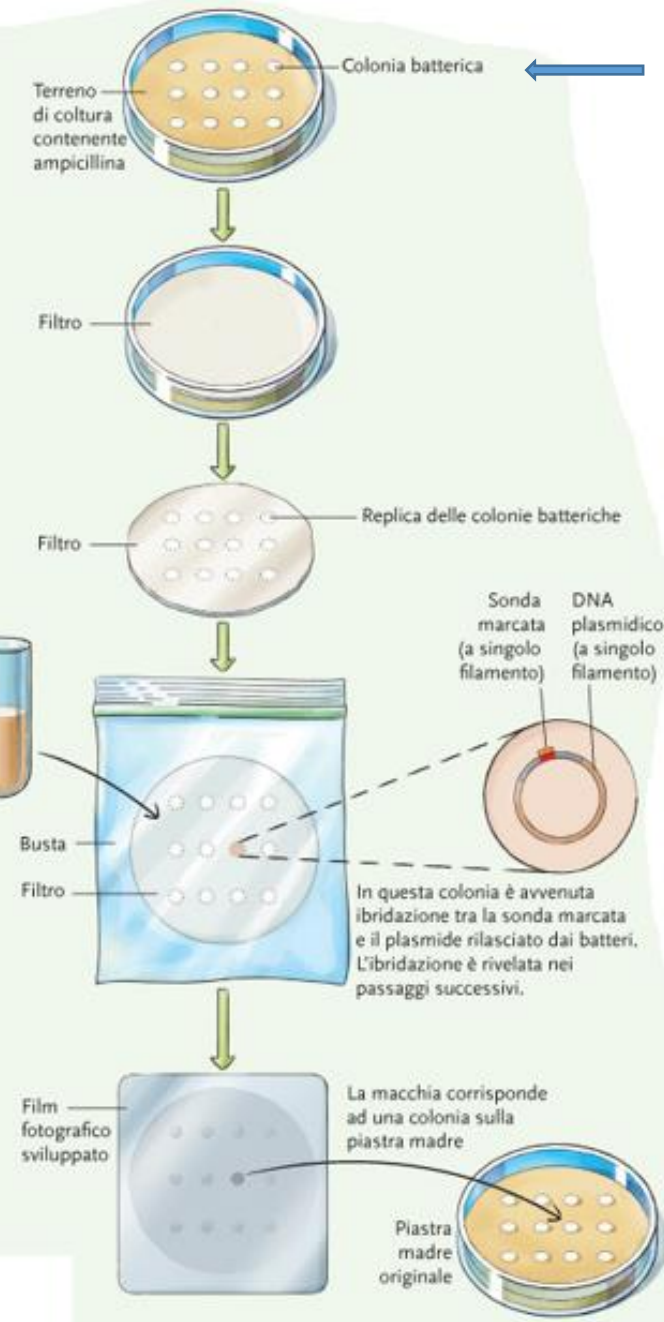
- Selezione genetica
- Ibridazione molecolare

Identificazione di una sequenza di DNA d'interesse tramite ibridazione del DNA

SCOPO: L'ibridazione con una sonda specifica di DNA permette ai ricercatori di identificare una sequenza selezionata, come ad esempio un gene, all'interno di una popolazione di molecole di DNA. In questo esempio, l'ibridazione del DNA è utilizzata per vagliare una collezione di colonie di batteri, allo scopo di identificare quelle che portano un plasmide ricombinante contenente il gene d'interesse.

PROTOCOLLO:

1. Prepara una piastra madre con colonie bianche, identificate attraverso il passaggio di screening blu-bianco descritto nella Figura 8.4. Queste colonie contengono batteri con plasmidi ricombinanti. Centinaia o migliaia di colonie possono essere esaminate per cercare il gene d'interesse utilizzando più piastre madre.
2. Deponi uno speciale filtro sulla piastra, per raccogliere un po' di cellule da ciascuna colonia. Questo produce sul filtro una copia della distribuzione di colonie.
3. Tratta il filtro per rompere le cellule e denaturare il DNA rilasciato in singoli filamenti. Il DNA a singolo filamento si appiccica al filtro nella medesima posizione in cui si trovava la colonia dalla quale deriva.
4. Aggiungi una sonda a singolo filamento (DNA o RNA) marcata specifica per il gene d'interesse e incuba. Il tracciante può essere radioattivo o non radioattivo. Se il frammento di DNA inserito nel plasmide ricombinante è complementare alla sonda, i due ibridizzeranno, cioè le loro basi si appaieranno l'eccesso di sonda.
5. Individua l'evento d'ibridazione, cercando il tracciante della sonda. Se la sonda era marcata con radioattivo, poni il filtro a contatto con un film fotografico. Il decadimento del composto radioattivo impressiona il film, generando una macchia scura quando il film è sviluppato. Correla la posizione della macchia scura sul film con la distribuzione originale delle colonie sulla piastra madre. Isola la colonia e utilizzala per produrre grandi quantità del gene di interesse.



ANALISI MOLECOLARE DNA, RNA, PROTEINE

Separazione macromolecole mediante elettroforesi (in gel di agarosio o acrilammide) in funzione delle dimensioni e della carica.

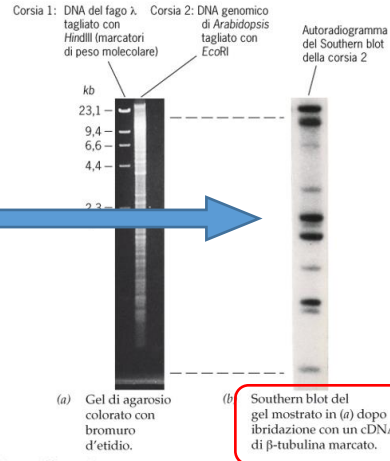
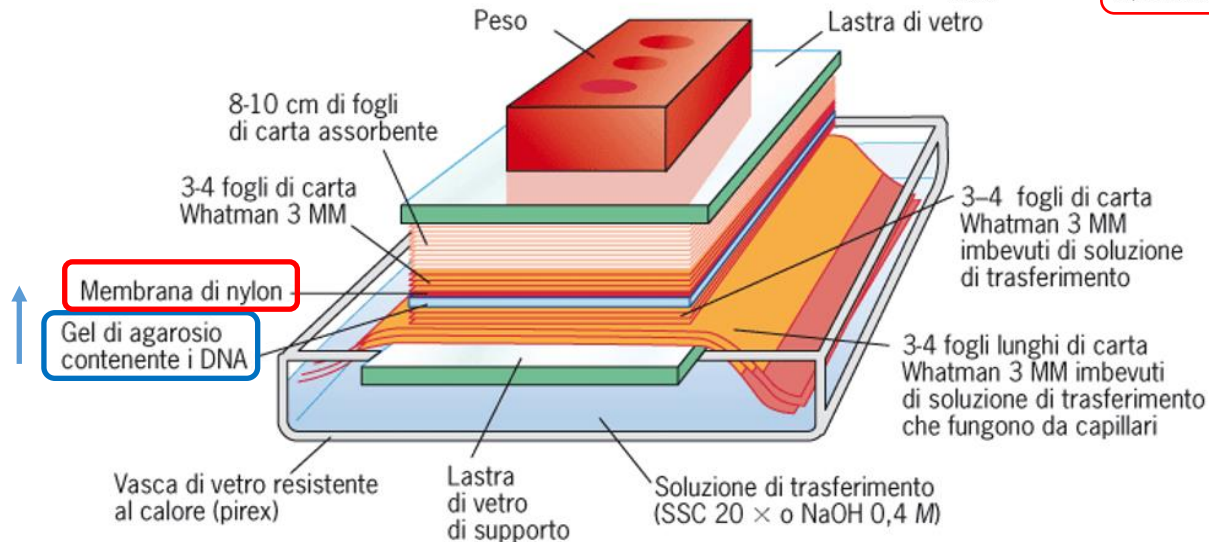
DNA → carica (negativa) costante per unità di massa

COME LOCALIZZARE I GENI SUI FRAMMENTI DI RESTRIZIONE

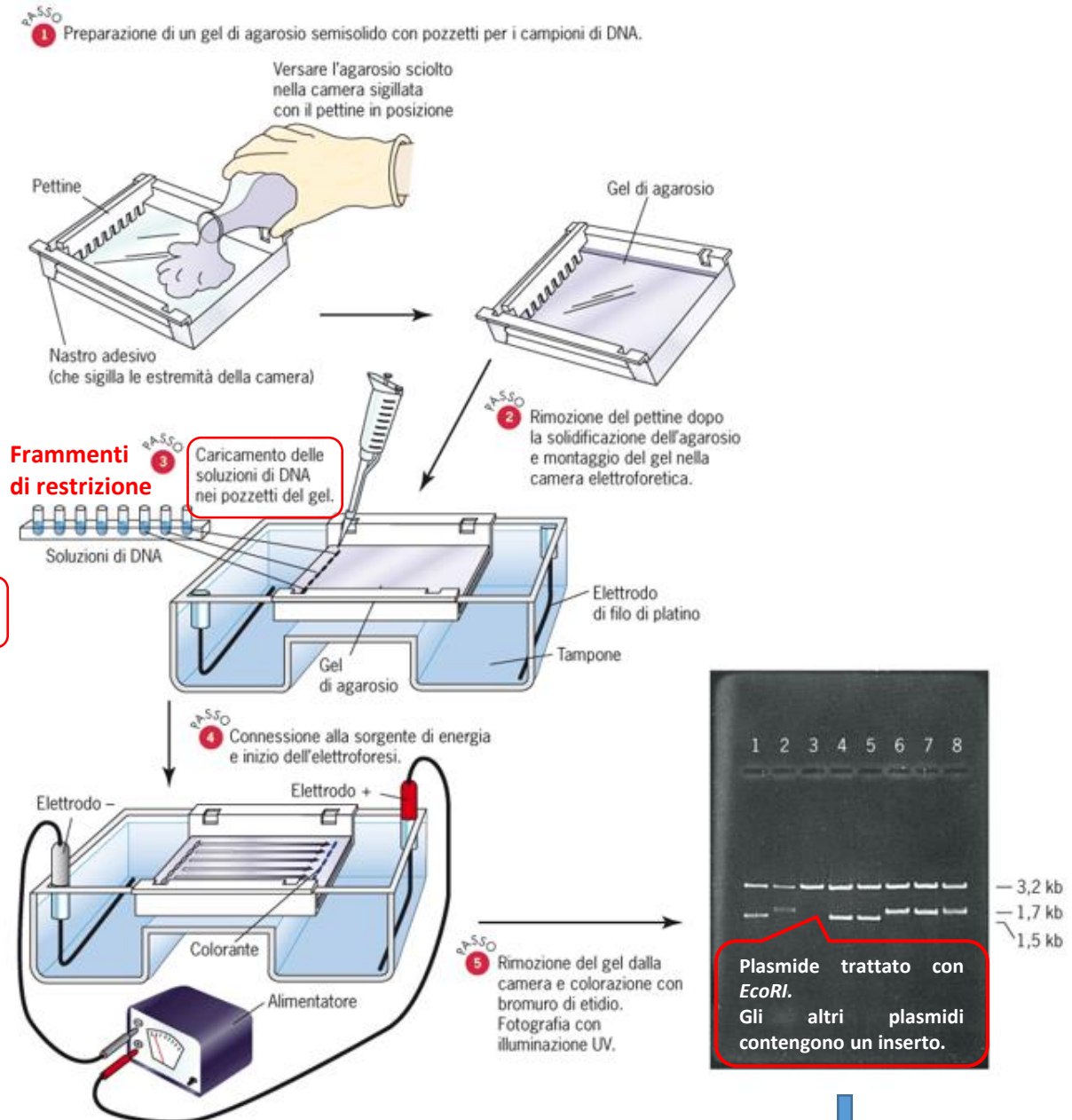
1) Separazione frammenti di restrizione di DNA mediante elettroforesi → → →

2) Southern blot trasferimento molecole di DNA su membrana di nylon o nitrocellulosa

essiccazione



Separazione frammenti di restrizione



ANALISI RNA

Northern blot

Tecnica basata sulla separazione delle molecole di RNA mediante elettroforesi.

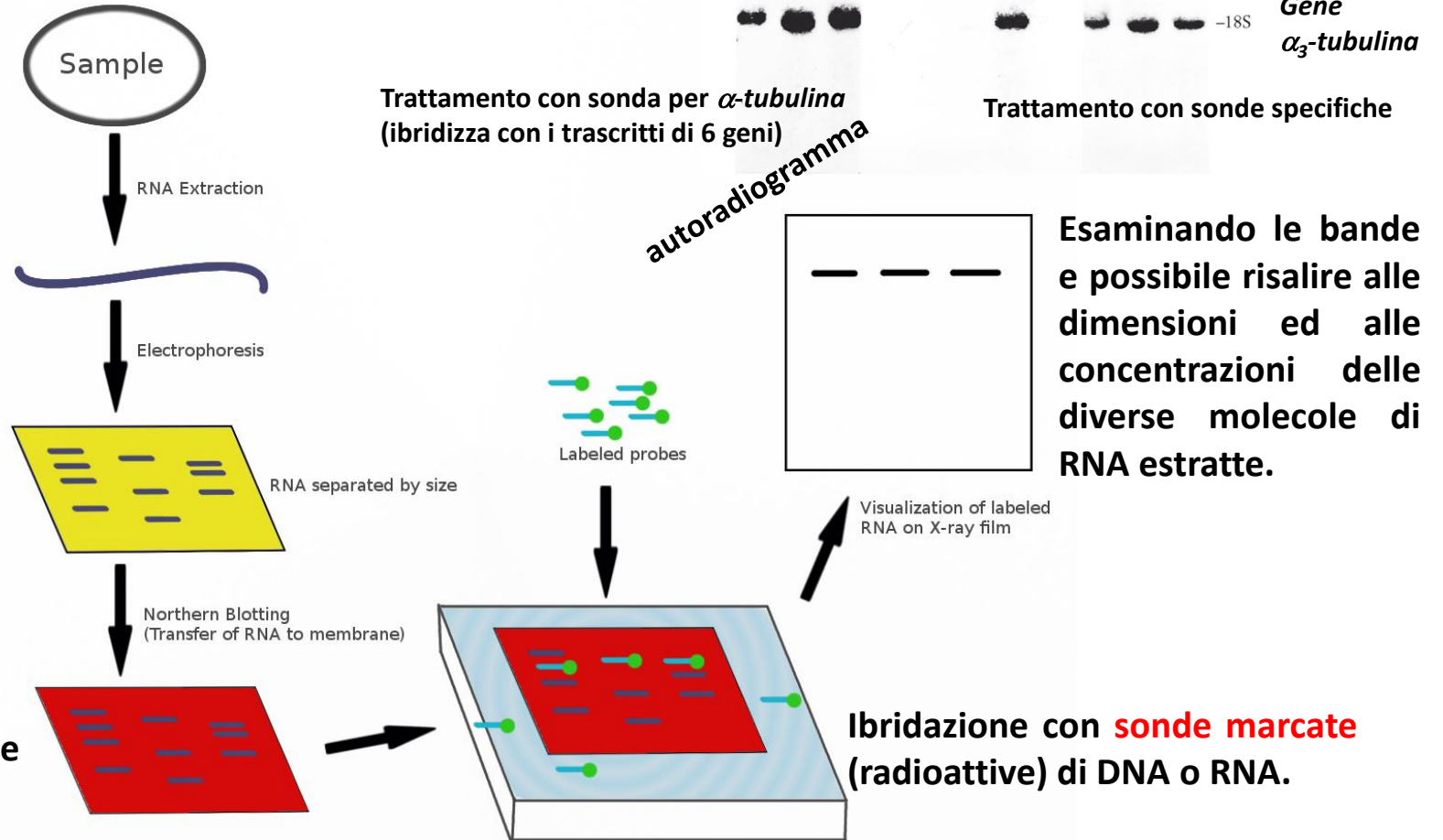
Procedura simile alla Southern blot.

Data la sensibilità delle molecole di RNA alle RNasi, è necessario limitare le contaminazioni dei materiali.

Le molecole di RNA, per eliminare le strutture secondarie, vengono **denaturate** con aggiunta di **formaldeide** o altri denaturanti al tampone per l'elettroforesi.

Colorazione delle bande con bromuro di etidio →

Trasferimento e fissazione dell'RNA alla membrana di nylon (**Northern blot**).



Esaminando le bande e possibile risalire alle dimensioni ed alle concentrazioni delle diverse molecole di RNA estratte.

Ibridazione con **sonde marcate** (radioattive) di DNA o RNA.

Il northern blot, analizzando l'RNA, consente di effettuare soprattutto studi relativi all'**espressione genica**:

- **In quali cellule e quando viene espresso un determinato gene,**
- **Grandezza di un mRNA codificato da un gene**
- ...

ANALISI RNA mediante RT-PCR

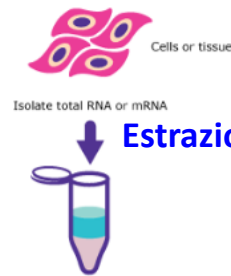
(*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
o reazione a catena della polimerasi inversa)

Tecnica basata sull'impiego della **trascrittasi inversa**.

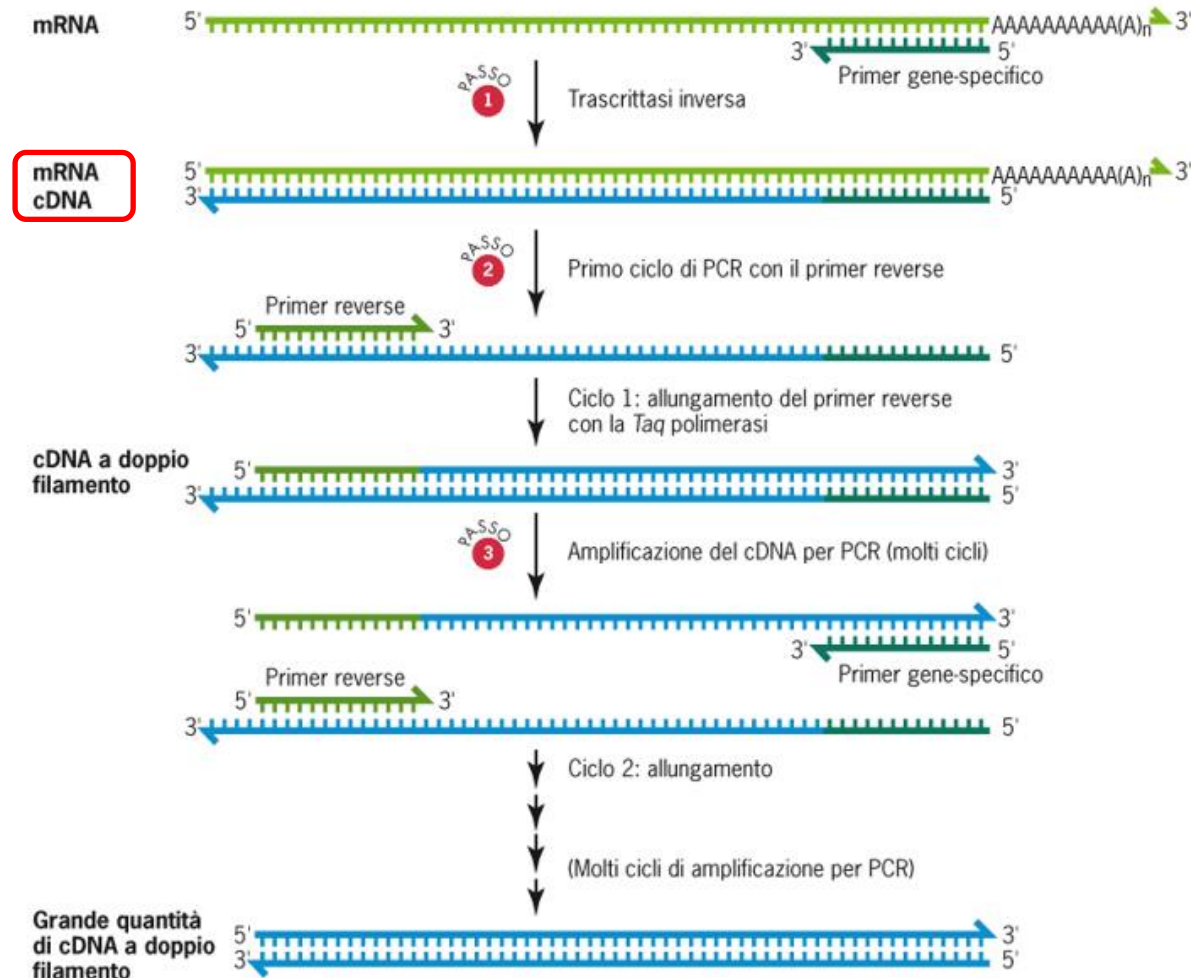
Dopo l'**estrazione**, le molecole di RNA o mRNA, mediante la **trascrittasi inversa**, vengono trascritte in filamenti di DNA complementari (**cDNA**).

Questa tecnica, dalla quantità di DNA ottenuto, consente anche di estrapolare la quantità di RNA presente nel campione di partenza.

Consente, inoltre, di verificare se un dato gene viene trascritto.



Estrazione RNA o mRNA dalle cellule

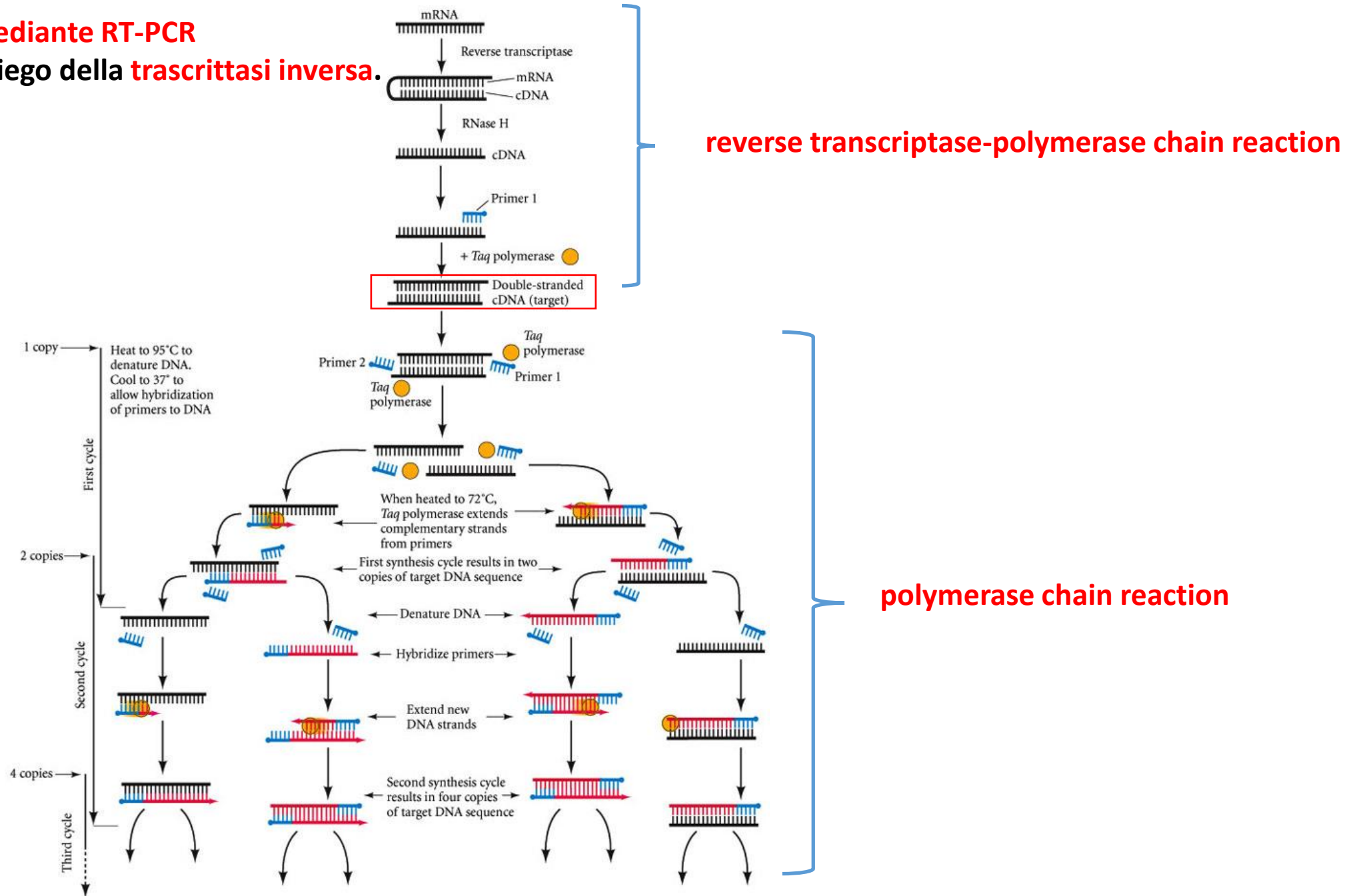


Può essere utilizzato un **primer oligo(dT)** oppure un **primer gene-specifico**.

↑
A differenza di un primer gene-specifico, un **primer oligo(dT)** amplifica tutti gli RNA della cellula.

Separazione, mediante **elettroforesi** e **studio dei prodotti dell'amplificazione**.

ANALISI RNA mediante RT-PCR
basata sull'impiego della **trascrittasi inversa**.



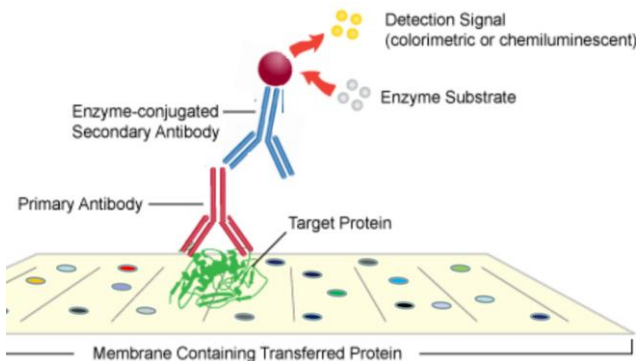
WESTERN BLOTTING

Tecnica basata sul trasferimento delle **proteine**, dopo elettroforesi, dai gel a **membrane di nitrocellulosa** e successiva identificazione con anticorpi.

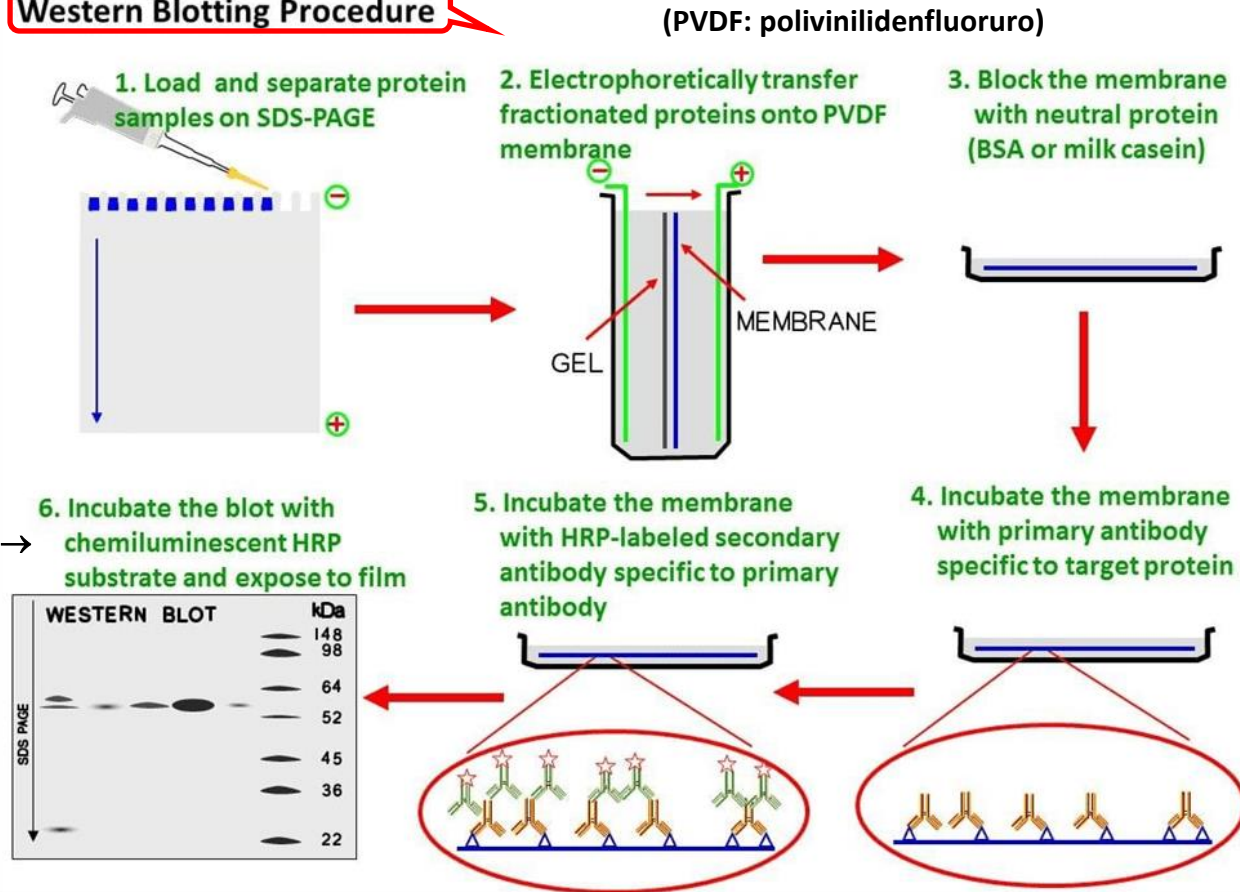
Dopo l'estrazione, le proteine vengono denaturate e sottoposte ad elettroforesi su gel di **poliacrilammide** in presenza di **sodio dodecilsolfato (SDS)**.

I polipeptidi separati vengono colorati con **blu Coomassie** o **nitrato d'argento**, oppure **trasferiti su membrana di nitrocellulosa (western blotting)**.

Perossidasi di rafano (**HRP**) →



Western Blotting Procedure



Immobilizzazione proteine sulla membrana

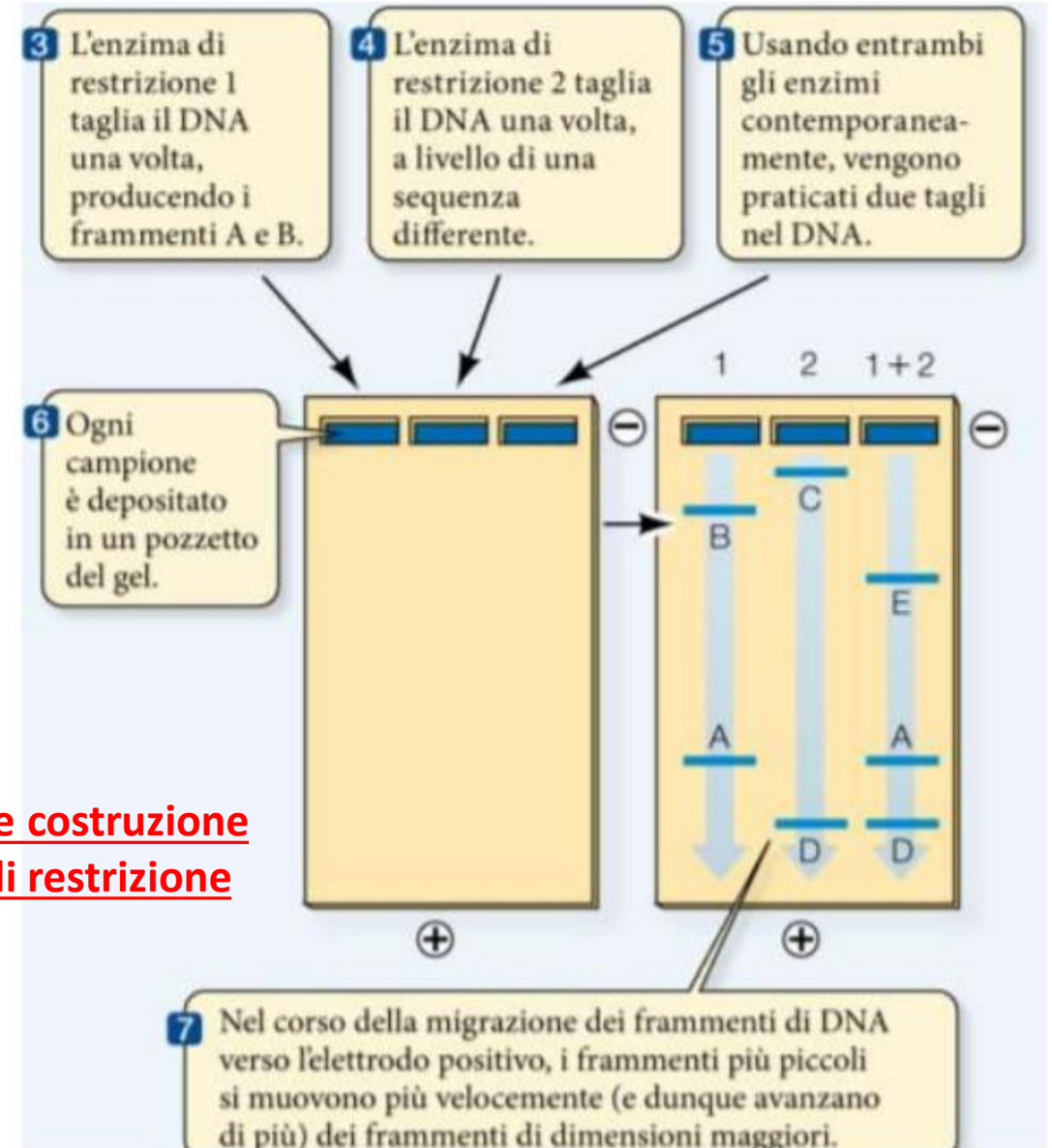
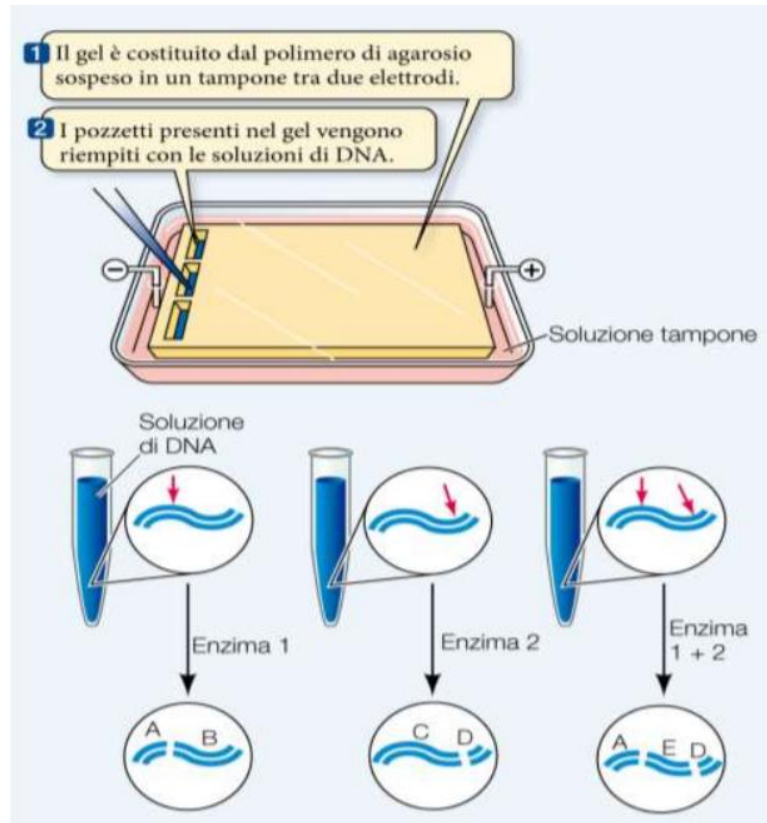
Identificazione mediante aggiunta **anticorpi specifici (primari)** per la proteina di interesse.

Dopo lavaggi, aggiunta **anticorpi secondari marcati (coniugati con un isotopo radioattivo o un enzima)**.

Uso **enzimi di restrizione** → **MAPPE FISICHE DEI CROMOSOMI** ← **sequenze nucleotidiche**
la **sequenza nucleotidica** rappresenta la **mappa fisica** di un **elemento genetico**

Frammenti di DNA, ottenuti con le **endonucleasi di restrizione**, possono essere separati mediante elettroforesi su gel di agarosio o di poliacrilammide.

Essendo la carica negativa del DNA costante per unità di massa, la separazione avviene in base alla topologia ed alla lunghezza del frammento.



Consente costruzione mappe di restrizione

Enzimi di restrizione → MAPPE FISICHE DEI CROMOSOMI ← sequenze nucleotidiche

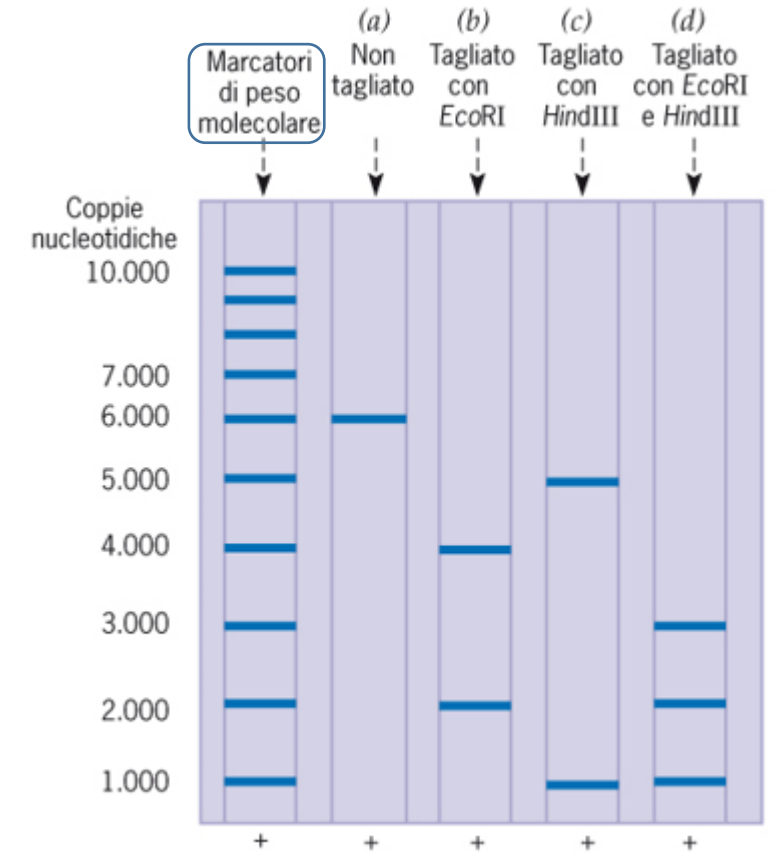
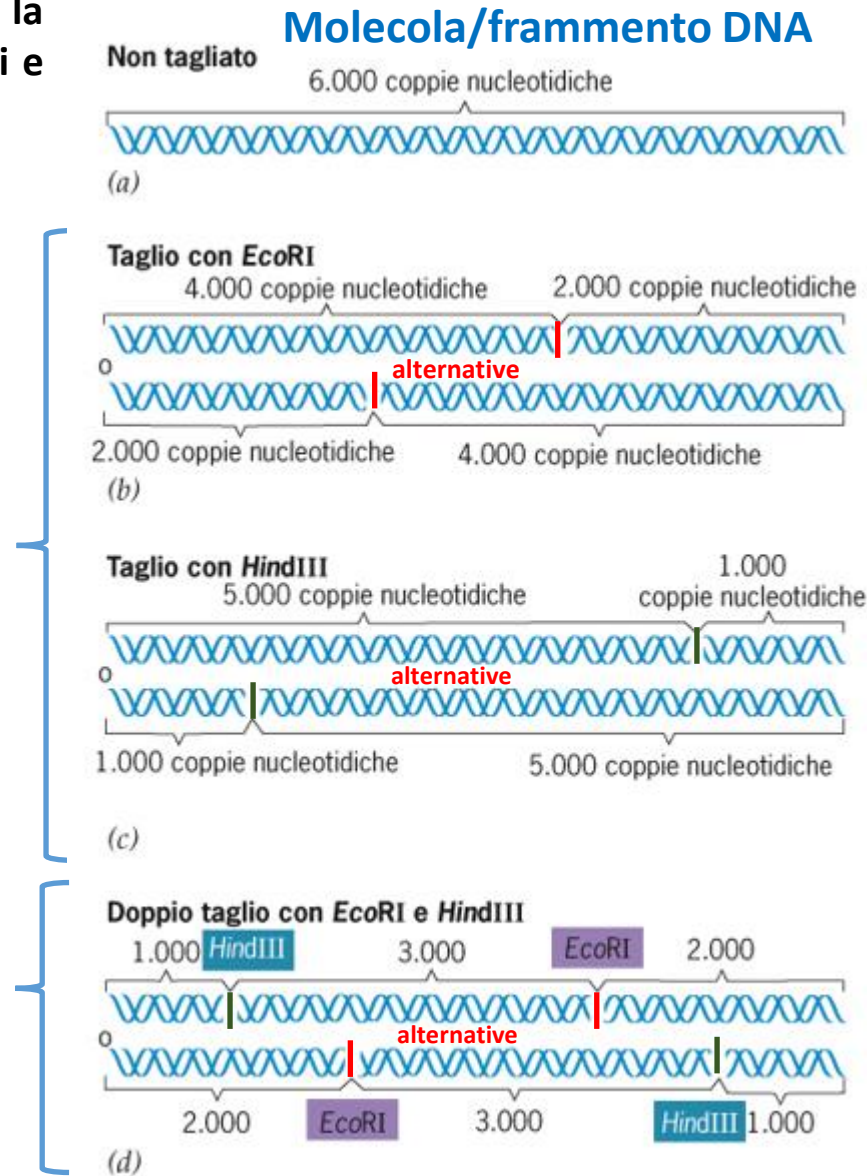
Gli enzimi di restrizione consentono la costruzione mappe di restrizione di geni e cromosomi.

La **mappatura dei siti di taglio** e le **dimensioni dei frammenti di restrizione** del DNA possono essere determinati, mediante elettroforesi, con l'uso di **marcatori di dimensione nota**.

Taglio con due endonucleasi di restrizione diverse

Taglio con entrambe le endonucleasi

Il frammento da 2000 pb non scompare: il taglio di *Hind III* è localizzato all'estremità opposta al sito di taglio di *EcoRI*.



L'uso di più endonucleasi di restrizione consente la costruzione di mappe fisiche dettagliate di interi cromosomi (**mappe di restrizione**).

Vere distanze fisiche sulla molecola di DNA

La **SEQUENZA NUCLEOTIDICA** rappresenta la completa caratterizzazione del gene.

Genomi sequenziati	
Virus	2442
Procarioni	
Archaea	105
Batteri	1978
Eucarioti	
Mammiferi	44
pesce	16
insetti	40
piante	38
Funghi	124
Protisti	47

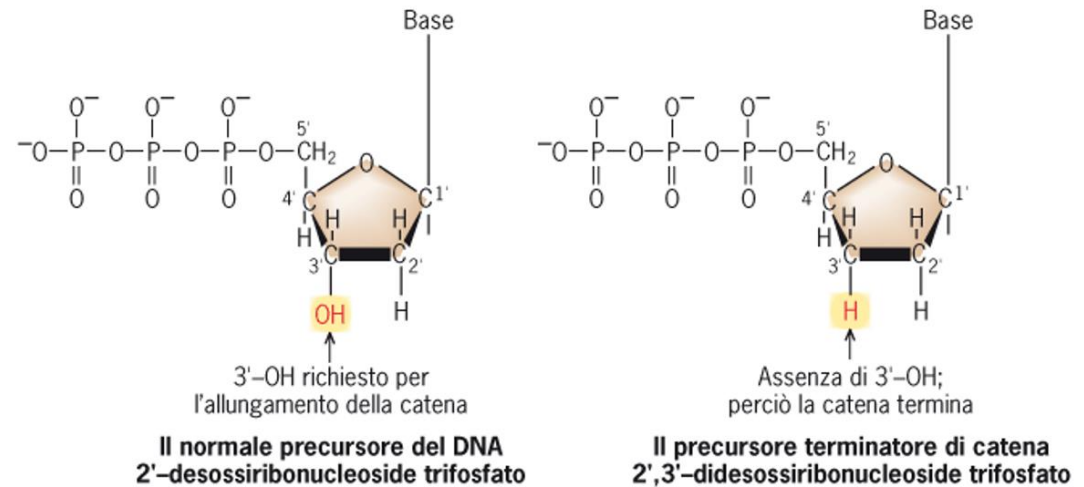
Sequenziata il 99% dell'eucromatina del genoma umano

Sequenziamento secondo Sanger (1977)

Definizione esatta sequenza dei nucleotidi sulla catena di DNA



Polimerizzazione del DNA in presenza di **2',3'-dideosiribonucleosiditrifosfato (ddXTP)** utilizzati come terminatori di catena.



ddATP
ddGTP
ddCTP
ddTTP

Marcati con fluorocromi diversi

dxTP:ddXTP → 100 (300):1

la possibilità che un ddXTP venga incorporato nel filamento in fase di allungamento è 1/100.

PASSO 1

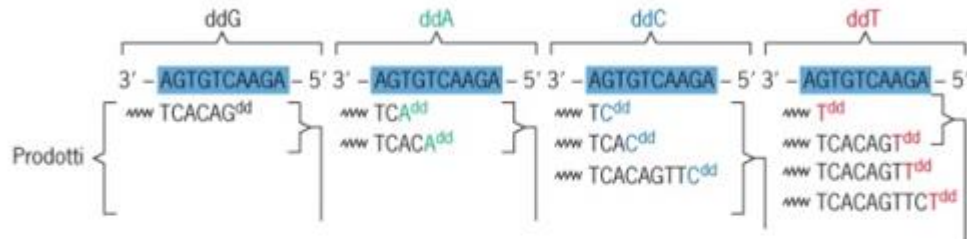
Preparazione di reazioni di polimerizzazione del DNA contenente i seguenti componenti:

Filamento stampo 3' - **AGTGTCAAGA** - 5' DNA polimerasi
 Filamento primer 5' -OH 3' dGTP, dATP, dTTP, e dCTP

Quattro terminatori di catena 2',3'-didesossiribonucleosidi trifosfato, ciascuno marcato con un fluorocromo differente:
 ddGTP, ddATP, ddCTP, e ddTTP. **dXTP:ddXTP → 100:1**

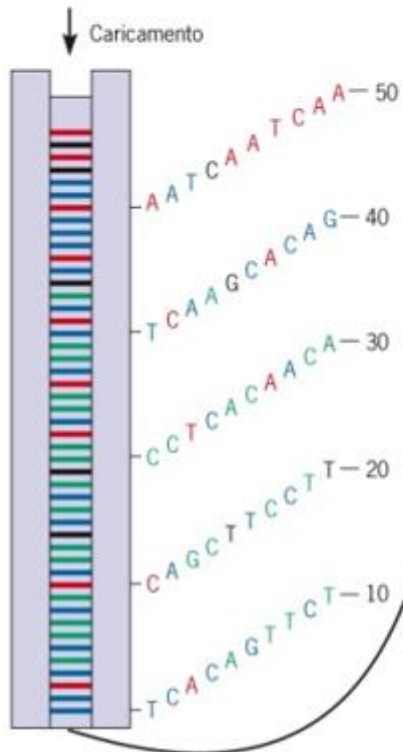
PASSO 2

Incubazione della miscela di reazione. I filamenti sintetizzati terminano con:



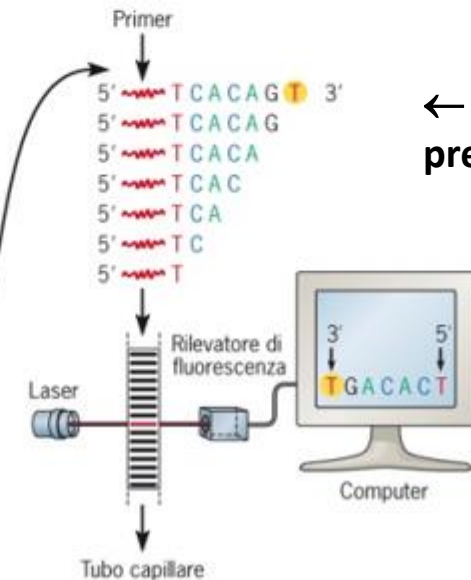
PASSO 3

Denaturazione dei prodotti e separazione per elettroforesi su gel di poliacrilammide.



PASSO 4

Registrazione della sequenza mediante l'uso di un laser, un rivelatore di fluorescenza e un computer



I filamenti più corti si muovono per primi

Fasi del sequenziamento secondo Sanger

in seguito ai processi di polimerizzazione, si genera una **popolazione di frammenti di DNA**.

Tutti i frammenti ottenuti presentano

- una estremità 5' identica
- Un'estremità 3' in tutte le posizioni possibili

← Ogni filamento che si muove durante l'elettroforesi presenta un nucleotide in più rispetto al precedente.

PASSO 5

Letture della sequenza di DNA dall'elaborazione del computer.

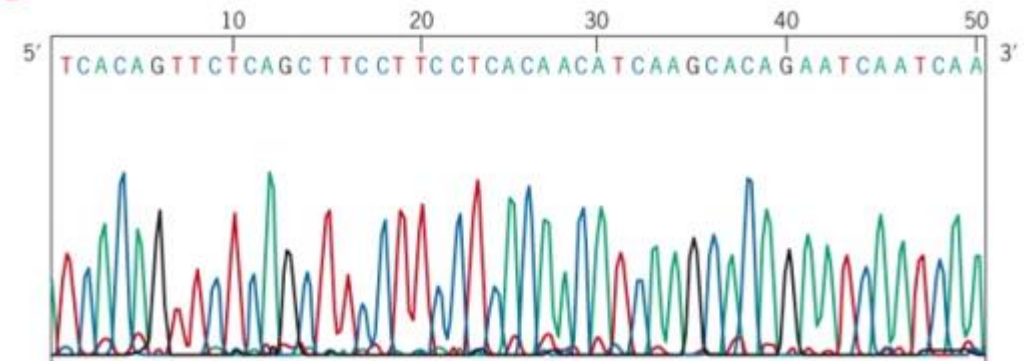


Figura 8.18 Un metodo di ricerca

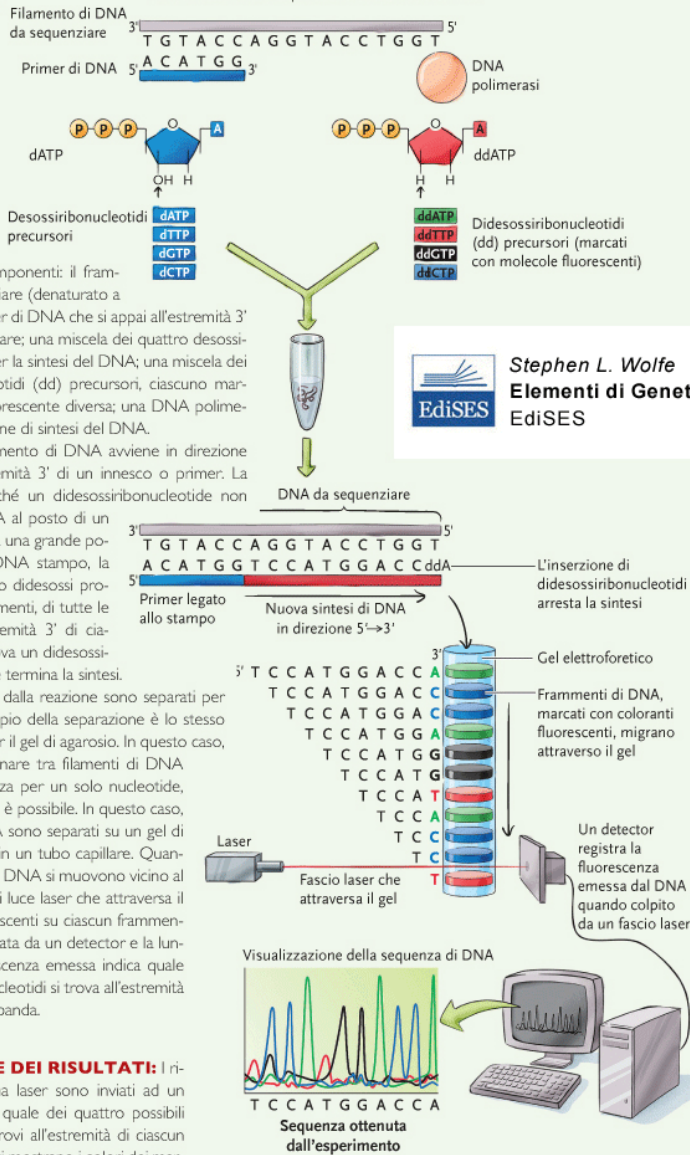
SCOPO: Ottenere la sequenza di un pezzo di DNA, come ad esempio nel sequenziamento di un gene o dell'intero genoma. Qui il metodo è mostrato con un sistema di sequenziamento automatizzato.

Il metodo didesossi (di Sanger) per il sequenziamento del DNA

PROTOCOLLO:

- Una reazione di sequenza didesossi ha i seguenti componenti: il frammento di DNA da sequenziare (denaturato a singolo filamento); un primer di DNA che si appai all'estremità 3' della sequenza da determinare; una miscela dei quattro desossiribonucleotidi precursori per la sintesi del DNA; una miscela dei quattro didesossiribonucleotidi (dd) precursori, ciascuno marcato con una molecola fluorescente diversa; una DNA polimerasi per catalizzare la reazione di sintesi del DNA.
- La sintesi di un nuovo filamento di DNA avviene in direzione 5' → 3' a partire dall'estremità 3' di un innesco o primer. La nuova sintesi continua finché un didesossiribonucleotide non viene incorporato nel DNA al posto di un desossiribonucleotide. Data una grande popolazione di filamenti di DNA stampo, la reazione di sequenziamento didesossi produce una serie di nuovi filamenti, di tutte le possibili lunghezze. All'estremità 3' di ciascun nuovo filamento si trova un didesossiribonucleotide marcato che termina la sintesi.
- I filamenti marcati prodotti dalla reazione sono separati per elettroforesi su gel. Il principio della separazione è lo stesso descritto nella Figura 8.9 per il gel di agarosio. In questo caso, però, è necessario discriminare tra filamenti di DNA che differiscono in lunghezza per un solo nucleotide, cosa che con l'agarosio non è possibile. In questo caso, perciò, i frammenti di DNA sono separati su un gel di poliaccrilammide preparato in un tubo capillare. Quando le bande di frammenti di DNA si muovono vicino al fondo del tubo, un fascio di luce laser che attraversa il gel eccita i marcatori fluorescenti su ciascun frammento. La fluorescenza è registrata da un detector e la lunghezza d'onda della fluorescenza emessa indica quale dei quattro didesossiribonucleotidi si trova all'estremità del frammento in ciascuna banda.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI: I risultati prodotti dal sistema laser sono inviati ad un computer, che interpreta quale dei quattro possibili marcatori fluorescenti si trovi all'estremità di ciascun filamento di DNA. I risultati mostrano i colori dei marcatori al passare delle bande attraverso il detector. Questi possono essere visualizzati sullo schermo del computer o stampati. La sequenza del nuovo filamento di DNA sintetizzato, che è complementare al filamento stampo, viene letta da sinistra (5') a destra (3'). (La sequenza mostrata in questo esempio inizia dopo il primer).



Stephen L. Wolfe
Elementi di Genetica
EdiSES

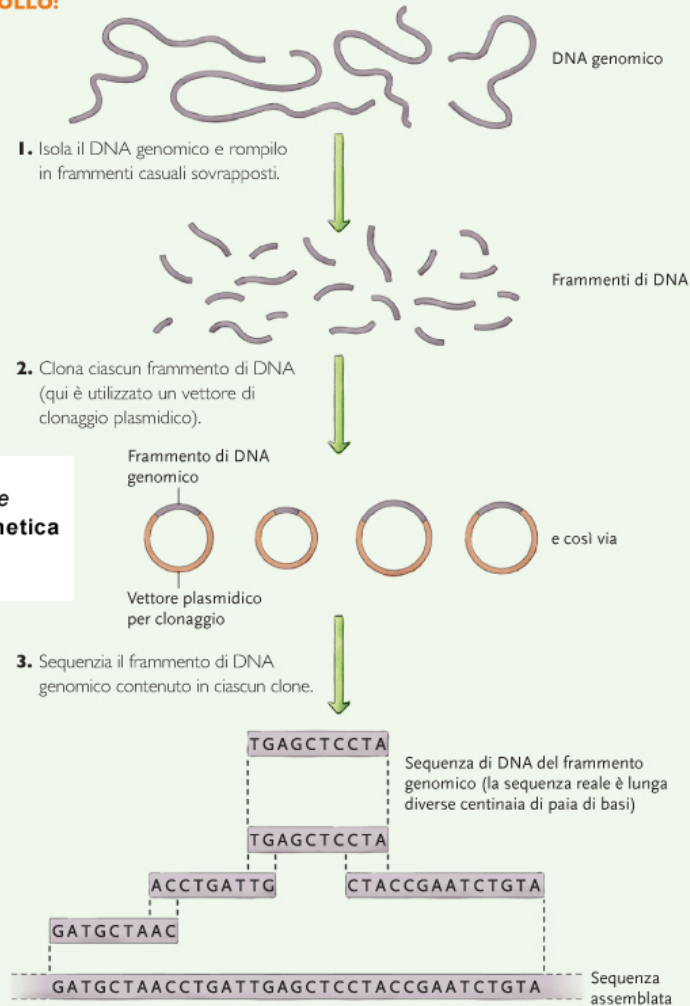
Moderne tecniche molecolari, in continua evoluzione, consentono il sequenziamento dell'intero genoma di un organismo.

Figura 8.19 Un metodo di ricerca

Sequenziamento whole-genome shotgun

SCOPO: Ottenere la sequenza completa del genoma di un organismo.

PROTOCOLLO:



Stephen L. Wolfe
Elementi di Genetica
EdiSES

WGS

Basato sulla produzione e sul sequenziamento di numerosi piccoli frammenti di DNA a cui poi è necessario assegnare un preciso ordine di assemblaggio.

L'assemblaggio dei piccoli frammenti di DNA si basa sulla presenza di sequenze nucleotidiche sovrapponibili (aventi la stessa sequenza di basi alle proprie estremità)