

### ESPRESSIONE PROTEINA CODIFICATA

- DNA clonato in vettore di clonaggio mantenuto in ceppo di mantenimento (E. coli DH5a)
- per esprimere pp codificata da dna donato, gene viene subclonato in vettore di espressione, plasmide con subclonatore e sequenze necessarie per espressione di dna
- subclonaggio effettuato con taglio con opportuni enzimi di restrizione sia il vettore che il gene, o con PCR
- ceppo di E. coli trasformato in plasmide di espressione ricombinante

#### trasformazione

- assunzione di dna da organismo
- 1970 Mandel ed Higa: batteri scaldati velocemente in soluzioni di CaCl2 potevano essere trasformati con dna esogeno => batteri competenti= capaci di assumere dna

#### elettroporazione

cellule batteriche con dna sottoposte a veloce scarica elettrica che permette formazione di elettroni che favoriscono entrata di dna (vettori altrimenti more organismi)

1. prelievo dna sorgente contenente dna bersaglio e di controllo
2. frammentazione enzimatica di entrambi i plasmide
3. ligatione: unione dna bersaglio a vettore di clonaggio

### ISOLAMENTO DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=DmTQd8mWQ>

- **ESPRESSIONE PROTEINE RICOMBINANTI**
- ottenuto dna che codifica una pp (piu semplice creare cdna da mrna)
- inserire in vettore di clonaggio/espressione
- indurre espressione della pp nell'ospite (E. coli)
- applicazioni: proteine di interesse terapeutico (anticorpi, insulina, ormoni)
- della cascata + proteine di interesse commerciale (per esempio per la produzione di anticorpi + agenti di ricerca di base e applicata)

isolamento con:

- EDTA, agitare eteene che lega ioni Mg<sup>2+</sup> necessari per attività enzimatica
- soluzioni che denaturano in pp e dna genomico
- quindi si centrifuga e dna plasmidico (piccolo superavvolto) recuperato nel surnatante - poi precipita in etanolo
- quindi concentrazione stimata misurando assorbanza DNA a 260 nm [DNA] = 50x260 microgrammi/ml

- introduzione del DNA nella cellula ospite, quindi isolamento delle cellule con gene clonato
- selezione di cellule che producono proteina di interesse
- infine produzione della proteina dal gene clonato
- tutto grazie ad **endonucleasi di restrizione**

#### TRANSFORMAZIONE

#### ENONUCLEASI DI RESTRIZIONE

- enzimi batterici (endonucleasi tipo II) che degradano dna
- riconoscono sequenze palindromiche di dna (stessa sequenza leggendo da destra a sinistra)
- taglio produce estremita' piatte blunt ends o coesive sticky ends
- EcorI: in ordine generale (E) - specie (co) - ceppo (R), primo ad essere classificato (I)
- non tutte pp tagliano allo stesso modo (vedi tabella slide 3.9)

#### esempi

1. sequenza palie (HaeIII): la sequenza di dna doppia elica viene tagliata formando due segmenti perfettamente simmetrici
2. estremita coesive (EcoRI): la sequenza con taglio stelsato creando estremita di lunghezza diverse, ma appiccicoso perché possono formare ponti H tra code a filamento singolo complementari

#### plasmidi

- molecola circolare di DNA a doppio filamento presente in cellule batteriche in grado di replicarsi autonomamente da cromosoma
- uno dei primi isolati è pBR322 come antibiotico
- plasmide di appoggio per sequenziamento (contiene polimerasi I per presenza gene donato) + mutacioning site o polilinker con siti di taglio per enzimi di restrizione

#### plasmide con estremita coesive

- plasmide e dna esogeno tagliati con stesso enzima di restrizione (che genera est- coesive)
- plasmide di appoggio per sequenziamento (contiene polimerasi I per presenza gene donato) + mutacioning site o polilinker con siti di taglio per enzimi di restrizione
- passaggio difficile perché plasmide può richiudersi senza dna ricombinante
- per il giusto orientamento necessario di 2 enzimi di restrizione che tagliano due filamenti diversamente (cosi meno prob. che plasmide si richiuda)

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmidi

- molecola circolare di DNA a doppio filamento presente in cellule batteriche in grado di replicarsi autonomamente da cromosoma
- uno dei primi isolati è pBR322 come antibiotico
- plasmide di appoggio per sequenziamento (contiene polimerasi I per presenza gene donato) + mutacioning site o polilinker con siti di taglio per enzimi di restrizione

#### plasmide con estremita coesive

- plasmide e dna esogeno tagliati con stesso enzima di restrizione (che genera est- coesive)
- plasmide di appoggio per sequenziamento (contiene polimerasi I per presenza gene donato) + mutacioning site o polilinker con siti di taglio per enzimi di restrizione
- passaggio difficile perché plasmide può richiudersi senza dna ricombinante
- per il giusto orientamento necessario di 2 enzimi di restrizione che tagliano due filamenti diversamente (cosi meno prob. che plasmide si richiuda)

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

#### plasmide pUC

- gene per la resistenza alla
- enzimi di replicazione per E. coli
- Multiple Cloning Site (MCS) o polylinker: siti di restrizione unici piu comuni
- MCS e parte del gene lacZ che codifica per la b-galattosidasi
- LAC operon: sistema di regolazione genica che sovrinverte la regolazione di geni per uso di attivoso

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di frammenti di dna

denaturazione

annealing

estensione

ripetizione

analisi

clonaggio

espressione

trasformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

isolamento

transformazione

elettroporazione

### CLONAGGIO CON PCR

Polymerase Chain Reaction

Key: Mullis - inventore di PCR

tecniche di amplificazione di

