

## CLONAGGIO ed ENZIMI DI RESTRIZIONE

Un processo di clonaggio porta alla formazione di copie identiche di un frammento di DNA in un ospite, che può essere per esempio E.Coli. In funzione del tipo di vettore utilizzato, che può essere plasmidico o fagico, si possono ottenere delle colonie batterico oppure delle placche fagiche. Il clonaggio è un processo in vivo perchè si sfrutta l'apparato di replicazione dell'ospite.

Per clonare un frammento di DNA all'interno di un vettore, esso deve avere delle caratteristiche tali da poter essere inserito e mantenuto all'interno dell'ospite. Queste caratteristiche permettono di differenziare l'ospite trasformato ricombinante dall'ospite originale e si utilizza poi un terreno che fa crescere solo gli ospiti ricombinanti.

Le tappe di un clonaggio sono:

- 1) digestione = taglio del DNA da clonare e del vettori di clonaggio da parte di specifiche endonucleasi di restrizione
- 2) ligazione= viene utilizzata una DNA ligasi per ripristinare i legami fosfodiesterici tra i due frammenti.
- 3) trasformazione= inserimento del DNA ricombinante nell'ospite, che viene appositamente reso competente.
- 4) piastramento= sopravvivenza solo del ceppo ricombinato in un terreno selettivo.
- 5) selezione= riconoscimento dei ricombinanti. Possiamo identificare una differenza tra selezione e screening, in cui la selezione avviene in presenza di antibiotici, mentre lo screening permette d'identificare i plasmidi che hanno ricevuto e assimilato il vettore, dai plasmidi non ricombinanti.
- 6) caratterizzazione= estrazione del DNA plasmidico, mappa di restrizione e sequenziamento.

Le endonucleasi di restrizione sono gli enzimi utilizzati per tagliare il vettore di clonaggio e il frammento di DNA d'interesse. Le nucleasi intervengono nell'idrolisi dei legami fosfodiesterici nelle molecole di acido nucleico. Possono essere specifiche per:

- RNA, quindi si tratta di RNAsi
- RNA H, quindi RNA associato a DNA nella forma di cDNA
- Aspecifiche per il tipo di substrato

Si possono differenziare anche in base al tipo di reazione che catalizzano:

- esonucleasi, quindi le estremità riconosciute sono esposte in substrati lineari o con nick
- endonucleasi, quindi idrolizzano legami interni, dove rimane esposto un gruppo P.

E' fondamentale riconoscere il versante di taglio rispetto al legame fosfodiesterico. Se avviene un taglio tra il P e il gruppo ossidrilico in 3', il fosfato rimane sul 5' e si lascia un'estremità 5' terminal fosfomonoesterica, mentre se avviene un taglio tra OH sul 5', il P rimane sul 3' e si forma un'estremità terminal 3'fosfomonoesterica.

Gli enzimi di restrizione sono enzimi adibiti alla difesa dai batteriofagi all'interno dei batteri, perchè degradano il DNA estraneo. Utilizzano un Mg<sup>2+</sup>. Contemporaneamente avviene una metilazione del DNA batterico, che permette quindi un riconoscimento tra self e non self, tramite appunto questi processi di restrizione-modificazione. I batteri metilano il DNA per proteggersi dagli enzimi di restrizione stessi, per evitare che riconoscano i siti di restrizione posti appunto sul loro DNA batterico.

Gli enzimi di restrizione si possono classificare in due differenti classi:

- classe I e III, in cui l'attività nucleasica è associata all'attività metilasica.
- classe II, in cui la metilazione e la restrizione sono poste su due molecole differenti. La specificità di taglio è elevata, tagliano su sequenze palindromiche metilate su DNA circolare e hanno un'elevata specificità di substrato.

Il sito di restrizione è la porzione che viene riconosciuta dagli enzimi di restrizione e ha estremità 3'OH e 5'P. Gli enzimi possono lasciare estremità BLUNT, come nel caso di SmaI, oppure estremità STICKY, come nel caso di BamHI e KpnI. Vengono quindi tagliati il vettore e il frammento target d'interesse, che avranno così estremità compatibili e complementari. Tuttavia non è sempre possibile che le estremità del vettore e le estremità del frammento siano compatibili, quindi dobbiamo adottare diverse strategie di clonaggio:

- 1) Usiamo enzimi che riconoscono siti differenti sul DNA, ma che lasciano le estremità compatibili. Si genera quindi un frammento da enzimi differenti, che verranno poi ligati tra di loro nel processo di ligazione.

2) Si utilizzano isochizomeri, quindi enzimi diversi che riconoscono lo stesso sito di restrizione. Essi possono lavorare o in modo uguale quindi tagliando allo stesso modo, oppure lasciando estremità differenti.

3) Le estremità piatte sono compatibili con altre estremità piatte.

Se l'enzima di restrizione lascia delle estremità protruding, esse possono essere rese piatte tramite una serie di strategie di clonaggio differenti:

1) Se abbiamo un'estremità 3' protruding, si utilizza una nucleasi S1, che elimina il single strand da una parte e dall'altra. Questa nucleasi è specifica per i single strand, non discrimina le estremità 5' e 3' protruding, utilizza  $Zn^{2+}$  e lavora a un pH 4,5. Con questa tecnica si vanno a perdere le informazioni poste sul frammento a single strand eliminato dalla nucleasi.

In alternativa, si può utilizzare la T4 DNA polimerasi. Essa ha attività polimerasica 5'-3', attività esonucleasica di proof-reading 3'-5', ma non presenta attività esonucleasica 5'-3' di nick translation. Si sfrutta quindi la sua capacità di fare nick translation, per rendere piatte le estremità del 3' protruding, rimuovendo i vari nucleotidi fino ad arrivare al single strand.

2) Se abbiamo un'estremità 5' protruding, si utilizza il frammento di Klenow, un oloenzima derivante dalla DNA pol a seguito di proteolisi. Aggiunge nucleotidi per rendere piatte le estremità dell'inserito, quindi attua un fill-in delle estremità 5' protruding. Ha attività polimerasica 5'-3', attività che viene sfruttata in questo processo, capacità di fare proof reading (5'-3'), ma non possiede attività 3'-5' di nick translation.

### ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Le tecniche elettroforetiche vengono utilizzate per identificare e separare bande derivanti dall'estrazione del DNA, servono per controllare l'avvenuta linearizzazione del vettore e dell'inserito e sono utili anche per il monitoraggio degli enzimi di restrizione, in questo caso si usa prevalentemente l'elettroforesi su gel di agarosio.

Si analizzano molecole con una carica netta all'interno di un campo elettrico: le molecole cariche positivamente, migreranno verso il catodo, carico negativamente, mentre quelle cariche negativamente, come il DNA e l'RNA in una soluzione tampone a pH 7,5/8, migreranno verso l'anodo.

Lo strumento elettroforetico è composto da un gel di agarosio, da una cella elettroforetica provvista di elettrodi e da un erogatore che fornisce corrente continua, che genera un gradiente di potenziale.

L'elettroforesi è sia una tecnica analitica, che una tecnica preparativa. Nel secondo caso si utilizza un gel "low melting", perchè è una tecnica utilizzata per la purificazione del DNA, che deve quindi essere poi recuperato dal gel. La velocità di migrazione dipende: dalle caratteristiche del campione, quindi dalla carica, dalla forma e dalle dimensioni; dal tampone utilizzato, che generalmente è tris acetato o tris borato e dal supporto scelto. I supporti possono essere gel di agarosio oppure gel di poliacrilammide. Il primo è usato per un'elettroforesi orizzontale nel trattamento di acidi nucleici, mentre il secondo è usato per un'elettroforesi verticale, impiegata nel sequenziamento del DNA.

L'agarosio è composta da una miscela di polisaccaridi isolati dalle alghe, lineari, costituiti da unità ripetute di agarobiosio. Le proprietà gelificanti sono conferite dai legami ad idrogeno che s'instaurano intra e extra molecolarmente alle catene di agarosio. Assume quindi una struttura reticolata, in cui le dimensioni dei pori sono determinate dalla concentrazione di agarosio. Si mantiene circa una percentuale di agarosio tra 0,8% e 1%, così si vanno a formare dei pori di dimensioni compatibili con i frammenti di DNA usati per il clonaggio. Dunque, si solubilizza il polimero con il tampone scelto fino a completa dissoluzione, tramite riscaldamento (si riscalda per disattivare qualsiasi attività DNAsica). Si aggiunge poi la soluzione in uno stampo con un pettine posto in orizzontale, in modo tale da creare i pozzetti in cui inserire il campione.

Il campione da analizzare viene addensato con l'aggiunta di glicerolo, in modo tale da farlo sedimentare alla base del pozzetto e viene aggiunto anche un colorante, che permette di monitorare la migrazione del campione. Quando si aggiunge una differenza di potenziale e un campo elettromagnetico, si osserva la migrazione del campione di DNA verso l'anodo.

Osserviamo poi questo movimento grazie alla presenza di bromuro di etidio, che può essere aggiunto prima del caricamento oppure prima della corsa elettroforetica, e osserviamo la formazione di bande, grazie all'emissione di fluorescenza. L'intensità delle emissioni è direttamente proporzionale alla quantità

di DNA presente in una banda oppure alla lunghezza della banda di DNA. La velocità di una molecola è inversamente proporzionale al logaritmo naturale del numero di paia di basi di cui è composta la sequenza: le molecole più grandi si muovono più lentamente, rispetto alle molecole di piccole dimensioni. Quando dobbiamo visualizzare una digestione totale, identifichiamo differenti bande, in cui i frammenti a peso molecolare maggiore, sono posti più in alto, mentre quelle a peso molecolare inferiore, sono poste in più in basso. Questo non vale per il DNA ladder, che è una miscela di frammenti, dato che al suo interno vi è una quantità differente di molecole per. Il DNA non si trova sempre in forma lineare e le varie conformazioni che assume hanno una velocità di migrazione sul gel elettroforetico differente:

-DNA superavvolto= ha una maggior mobilità elettroforetica, dato che gli attriti sono ridotti al minimo e passa tranquillamente nei pori

-DNA lineare= capacità buona di riorientamento nel campo elettroforetico

-DNA rilassato= minor mobilità rispetto alle tre forme

Come risaliamo a una perfetta estrazione? osserviamo una banda sola di DNA superavvolto, con in aggiunta delle altre bandee con intensità differenti. Il peso molecolare di queste bande è lo stesso, quindi la presenza delle varie bande indica che si ha una diversa quantità di DNA nelle varie forme.

### LIGAZIONE

La ligazione è il processo che porta alla riformazione di legami fosfodiesterici tra vettore e frammento da clonare, formando una molecola covalentemente chiusa. La DNA ligasi è l'enzima coinvolto in questa reazione e può essere di origine batterica, che utilizza il NAD<sup>+</sup> come cofattore o di origine virale ed eucariotica, che utilizza l'ATP come cofattore.

La DNA ligasi più utilizzata è quella derivante dal fago T4, che è in grado di legare anche estremità blunt. La reazione è la seguente:

- 1) L'ATP viene utilizzata per la formazione di un intermedio con la ligasi, AMP-ligasi, con la successiva liberazione di un gruppo pirofosfato.
- 2) L'AMP si lega al 5'P del nucleotide, creando un composto ad alta energia.
- 3) L'O del gruppo OH al 3' attacca sul fosfato, liberando l'AMP e l'enzima, generando un legame fosfodiesterico.

Le estremità 5'P e 3'OH sono quindi fondamentali.

La reazione può avvenire sulle estremità blunt, 5'-protruding e 3'-protruding. L'efficienza della ligasi è maggiore con le estremità protruding, dato che esse in soluzione spontaneamente si avvicinano. Infatti la ligasi ha differenti Km in base al substarto: nel caso delle estremità 3' o 5' protruding, essa ha un valore di 0,5 microM, mentre nel caso di estremità blunt, essa assume un valore di 50 microM.

Come si può quindi favorire la reazione per frammenti blunt?

Si può cercar di diminuire l'energia cinetica, abbassando la temperatura di reazione, tenendo però sempre conto dell'optimum di funzionamento dell'enzima oppure si può aumentare la densità del frammento aggiungendo del PEG. Si può anche aumentare il tempo di reazione, per aumentare a sua volta l'attività enzimatica anche a basse temperature e si può anche ridurre il volume, per aumentare la probabilità che le estremità si appaino.

Generalmente s'inserisce in rapporto 3:1 o 5:1 la miscela vettore-frammento di DNA, in modo da favorire la reazione intermolecolare tra inserto e vettore.

Sempre per favorire la reazione intermolecolare, si può rimuovere il gruppo fosfato al 5' del vettore, impedendo quindi che la molecola si richiuda su se stessa. Questo avviene grazie all'azione di una fosfatasi alcalina, che può essere di tipo BAP, CIP o SAP. Dunque, le basi terminali del vettore sono 3'-OH e 5'-OH, mentre le estremità del DNA bersaglio sono 5'-P e 3'-OH. L'estremità 5' dell'inserto si appaia con l'estremità 3'OH del vettore, formando il legame fosfodiesterico. Questo non avviene nel caso delle altre due estremità, che non si possono appaiare dato che sono entrambe H. La molecola risulta essere comunque stabile, dato che quando inseriamo il DNA ricombinante all'interno dell'ospite, le estremità vengono sottoposte all'azione dei sistemi di riparazione dell'ospite stesso.

Per non defosforilare le estremità si può agire nel seguente modo:

-prima tagliamo il vettore con una tipologia di enzimi di restrizione

-sottoponiamo i frammenti a elettroforesi su gel di agarosio, per verificare la corretta linearizzazione

-attuiamo un secondo taglio con enzimi che lasciano estremità differenti, come per esempio una blunt e l'altra 5' protruding. Anche l'inserito dunque dovrà essere processato nello stesso modo.

Questo metodo è utile per controllare, stabilire e vincolare l'orientamento dell'inserito nel vettore, soprattutto quando esso viene inserito dopo un promotore.

### METILAZIONE

La metilazione è il sistema mediante il quale i batteri riconoscono il self dal non self. Il DNA genomico batterico è metilato, dunque non viene riconosciuto dagli enzimi di restrizione. Se introduco del DNA esogeno, esso viene degradato perchè è riconosciuto come non self.

La metilazione avviene su Adenina e Citosina. Necessitiamo di un donatore di gruppo metilico, ovvero SAM e di enzimi responsabili del trasferimento, chiamati DNA-METIL-TRANSFERASI. Queste transferasi possono essere associate ad enzimi di restrizione oppure possono essere NON direttamente associate ad essi. La seconda categoria è quella più utilizzata. In E.Coli sono presenti due sistemi di metilazione, il sistema dam e il sistema dcm. Il sistema dam riconosce il sito GATC e metila sull'N6 dell'A, mentre il sistema dcm riconosce la sequenza CCAGG o CCTGG, che metila sul C5 della C vicino a una A o a una T. A volte queste sequenze sono presenti all'interno delle sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione. I complessi dcm+ e dam+ metilano le sequenze del DNA ricombinante inserito, ma se queste sequenze sono all'interno dei siti di restrizione, l'enzima non è più in grado di riconoscere e di tagliare e dunque il sito non è più visibile a livello di una mappa di restrizione. Questo è da tenere ben in considerazione quando s'inserisce per mutagenesi questi siti di riconoscimento, perchè non devono essere metilati da dam+ e dcm+.

Alcuni enzimi di restrizione, come Dnpl, tagliano una sequenza solo se essa è stata precedentemente metilata. La porzione riconosciuta è GATC e l'enzima taglia quando l'A è metilata dal sistema dam+.

In PCR in vitro, non abbiamo un sistema dam, dunque il DNA sintetizzato non verrà metilato e l'enzima Dnpl verrà utilizzato per eliminare il template prima della fase di amplificazione.

### TRASFORMAZIONE

Una volta che è avvenuto il processo di digestione e ligazione del complesso vettore-plasmide in una molecola circolare compatta, questa può essere inserita all'interno di una cellula ospite. Il microorganismo che funge da ospite deve avere una serie di caratteristiche che lo rendano facilmente maneggiabile in laboratorio, deve essere poco costoso e deve produrre dei cloni facilmente isolabili. La trasformazione di una cellula ospite, come E.Coli, avviene nella fase esponenziale del ciclo cellulare, dove abbiamo una maggior permeabilità della parete e di conseguenza otteniamo un maggior up-take di DNA esogeno, mentre nella fase stazionaria avviene la modifica della parete batterica, per aumentare la resistenza ad agenti esterni. Il sistema ospite più usato è E.Coli, che è stato geneticamente modificato per avere una capacità di autoreplicazione del DNA, per modificare i siti di restrizione e per favorire la trasformazione. In alcuni specifici casi, sono state aggiunte anche altre modifiche, come la sensibilità all'ampicillina e alla tetraciclina, per favorire la selezione, oppure l'espressione parziale del gene che codifica per la beta-galattosidasi. Infatti molto spesso ritroviamo solo la porzione C-terminale dell'alpha peptide.

La trasformazione può avvenire con DNA fagico, estratto e usato come vettore, con DNA plasmidico in vitro, oppure tramite un'infezione da parte dei fagi. Nei primi due casi, E.Coli deve essere reso competente alla trasformazione. Per fare questo possiamo sottoporre il sistema a due metodiche differenti: calcio cloruro ed elettroporazione.

Nel metodo chimico del calcio cloruro, viene inserita una quantità di  $Ca^{2+}$ , ioni positivi, al fine di schermare la repulsione elettrostatica che si forma tra il DNA e il gradiente di potenziale della membrana di E.Coli. I pori dunque devono dilatarsi abbastanza da favorire l'entrata del DNA esogeno. Tuttavia, il  $Ca^{2+}$  ha anche degli aspetti negativi: nonostante riesca a formare dei legami ionici ogni volta che incontra delle cariche di segno opposto al suo, è comunque poco solubile e se posto in quantità non regolate, può far precipitare il DNA.

Sperimentalmente procedo nel seguente modo:

-isolamento di E.Coli in fase esponenziale tramite centrifugazione

-aggiunta di  $CaCl_2$  e passaggio in ghiaccio

-passaggio poi a una temperatura ambiente e poi successivo shock termico a 42 gradi

-aggiunta di DNA

-aggiunta di terreno LB

-incubazione a 37 gradi per 1 ora

-piastramento e selezione, in presenza di antibiotici

Nel metodo fisico dell'elettroporazione, non possiamo conservare i campioni in criptobiosi.

Sperimentalmente operiamo nel seguente modo:

-da un terreno liquido, isoliamo in fase esponenziale E.Coli per centrifugazione

-risospendo in acqua e poi metto il tutto in ghiaccio

-risospendo una seconda volta e aggiungo il DNA

-impulsi elettrici al campione, in modo da favorire un'apertura transiente delle porzioni di adesione tra la membrana e la parete.

-aggiunta di un terreno liquido non selettivo, incubazione e piastramento in un terreno solido selettivo.

### ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Dopo l'ottenimento dei trasformanti e la selezione, è necessario attuare una purificazione della molecola di DNA, per poi caratterizzarla. Questo processo di purificazione prevede la rimozione di tutte le componenti cellulari non d'interesse, quindi proteine, acidi nucleici, acidi grassi, basandoci sulle differenze chimico-fisiche tra di esse.

Il problema più grande durante la purificazione è riuscire a separare il DNA plasmidico dal DNA cromosomale. Essi infatti presentano la medesima composizione chimica, formata dallo stesso tipo di polimero e dagli stessi legami fosfodiesterici. Possiamo però differenziare le due tipologie di DNA, in base alle caratteristiche fisiche:

-il cromosoma batterico presenta da una a due copie di DNA e ha una dimensione di 4,6 Mb.

-il DNA plasmidico si trova invece in un range di dimensioni tra 5-11 Kb e presenta una conformazione molto superavvolta.

Una delle metodiche più diffuse e più utilizzate per la purificazione del DNA plasmidico d'interesse, prevede cicli intermittenti di denaturazioni e rinaturazioni, che permettono la separazione delle due tipologie di DNA in base alle caratteristiche fisiche.

Il protocollo sperimentale è il seguente:

-da una sospensione cellulare ottenuta da una coltura, attuiamo una lisi cellulare che ci permette di ottenere un lisato contenente le varie componenti cellulari

-aggiungiamo una soluzione alcalina con detergente anionico SDS, che porta un cambiamento dello stato di protonazione della soluzione, con una deprotonazione dei gruppi amminici, che perdono la carica positiva, e i gruppi ossidrilici cedono il protone, acquisendo una carica negativa. L'innalzamento del pH porta a un cambiamento dello stato di protonazione comporta una perturbazione nella possibilità di creare dei legami a idrogeno tra le varie basi azotate, in questo modo abbiamo un'apertura della doppia elica, data da una denaturazione del double strand.

-se aggiungiamo un opportuno tampone, riusciamo a ristabilire le condizioni di pH fisiologico, ripristinando una corretta protonazione tra le basi. Il processo di rinaturazione avviene a Temperatura bassa con una buona concentrazione salina. In questo passaggio osserviamo la differenza tra DNA plasmidico e DNA cromosomale. Nel primo caso, il DNA plasmidico, avendo una struttura di piccole dimensioni, molto concatenata per effetto dei superavvolgimenti, è soggetto a una tempestiva riformazione dei legami fosfodiesterici tra le basi. Nel caso invece del DNA cromosomale questo non avviene, infatti la struttura di questo DNA è molto lassa quindi è molto più fragile e non è soggetta a una rinaturazione totale. Le basi non andranno a riappaiarsi nel modo corretto, si forma così un reticolato insolubile e il DNA cromosomale precipita.

Questo protocollo è utile anche per la rimozione di proteine, (la carica netta della proteina diminuisce andamento decrescente della curva di titolazione), che vengono anch'esse alterate dal pH alcalino, con una successiva denaturazione strutturale. L' SDS, il sodio dodecil fosfato, che è un detergente anionico, porta alla denaturazione delle proteine e interagisce anche con gli acidi grassi, quindi con le componenti delle membrane degradate, emulsionandoli.

Dunque, dopo i cicli di rinaturazione-denaturazione, nel pellet rimangono solo DNA plasmidico e RNA. Al fine di assicurarsi di avere un campione completamente puro, sottoponiamo il surnatante a un'ulteriore precipitazione e a una risospensione in etanolo o isopropanolo. L'affinità degli alcoli a corta catena per l'acqua, portano alla disidratazione dell'acido nucleico, che viene reso insolubile. Con una centrifugazione poi otteniamo un pellet con solo acidi nucleici di nostro interesse, senza alcuna contaminazione aggiuntiva.

Per conservare il DNA plasmidico purificato, possiamo aggiungere una soluzione di TRIS EDTA a pH 8. L'RNA viene rimosso per digestione enzimatica, con aggiunta di un'RNasi, che porta all'idrolisi dell'RNA rimasto.

## PCR

La PCR è una tecnica in vitro, in grado di amplificare sequenze specifiche fino a 1 milione di volte. L'unica condizione da rispettare è conoscere le sequenze confinanti al segmento di DNA che voglio amplificare. La PCR mima in vitro la duplicazione ed è utile per il clonaggio, per definire il target usato nelle sonde, usate poi nello screening, nelle librerie a cDNA e genomiche e si può abbinare alla retrotrascrizione, per amplificare il cDNA nel processo di RT-PCR.

Può essere sia quantitativa, ovvero processo che riesce a definire la quantità di DNA in un campione, sia qualitativa, abbinata a mutagenesi, sonde, mappe di restrizione...

Cosa è utilizzato come reagenti per la PCR:

### 1) TEMPLATO

Viene generalmente utilizzato del DNA double strand, che può essere omogeneo, quindi plasmidico, in cui il target è contenuto ugualmente in tutti i cloni, oppure eterogeneo, ovvero genomico, in cui sono contenuti anche geni che non presentano il DNA target.

### 2) DNA POLIMERASI

La DNA polimerasi utilizzata nella PCR è termostabile con capacità di polimerizzare ad alte temperature. Sono di tre: Taq, Pfu e Vent. Devono avere delle caratteristiche generali comuni:

- processive
- attività 5'-3' sia di polimerizzazione, che di nick traslation
- attività 3'-5' di proof reading
- buona velocità

Le differenze tra le tre DNA polimerasi termostabili stanno nella stabilità e nelle temperature tollerate, ma soprattutto nell'attività di proof-reading. La Taq ha scarsa attività di proof-reading, mentre Pfu e Vent hanno un'alta attività esonucleasica 3'-5'.

In base a quello che vogliamo ottenere, usiamo una delle tre DNA pol:

- se vogliamo identificare la presenza di un tratto di DNA, utilizziamo un enzima con scarsa attività di proof-reading
- se vogliamo introdurre volontariamente degli errori per mutagenesi, usiamo una Taq
- se il DNA deve essere espresso, utilizziamo una Pfu o una Vent.

La fedeltà di replicazione e l'accumulo di errori dipendono molto dalla concentrazione di nucleotidi, di  $Mg^{2+}$ , dalla lunghezza del target e dal numero di cicli che attuamo.

### 3) NUCLEOTIDI TRIFOSFATO e $Mg^{2+}$

Le concentrazioni di dNTPs e  $Mg^{2+}$  devono essere bilanciate e non limitanti. Dobbiamo monitorare le concentrazioni al fine che non influenzino la processività delle polimerasi, a meno che non vogliamo inserire volontariamente delle mutazioni per mutagenesi.

### 4) PRIMER con OLIGONUCLEOTIDI

Sono lunghi generalmente 18-30 bp (circa 25 di media). E' necessario conoscere le estremità fiancheggianti il target per costruire i primer.

La PCR è composta da tre passaggi che si ripetono ciclicamente

- 1)denaturazione del DNA a circa 95 gradi per rendere i due strand accessibili all'apparato enzimatico.
- 2)abbassamento della temperatura a 65 gradi circa, per favorire il posizionamento dei primer, che sono un po' l'equivalente delle primasi nella replicazione in vivo, sul template. La temperatura deve essere ideale per l'annealing di entrambi i primer contemporaneamente e deve essere di circa 4 gradi inferiore

della temperatura di melting.

3) allungamento, che avviene a temperatura di circa 72 gradi, sfruttando l'attività enzimatica 5'-3' della DNA polimerasi.

Il processo viene ripetuto in modo ciclico, fino a 30 volte.

A seguito del primo ciclo otteniamo il DNA template, con un frammento di neosintesi delimitato ad una estremità da un oligonucleotide. Il template aumenta in modo lineare, mentre a seguito del secondo ciclo, si andranno a formare dei frammenti composti da due filamenti di neosintesi, delimitati da oligonucleotidi a un'estremità. Il terzo ciclo è quando si presenta l'amplicone, ovvero il frammento di DNA double strand specifico, delimitato dagli oligonucleotidi e della lunghezza richiesta. Come se fosse una sintesi semiconservativa, abbiamo un aumento esponenziale dell'amplicone. Abbiamo poi un accumulo, dopo 30 cicli circa, possiamo approssimare il numero di copie di DNA totali al numero di ampliconi, per avere un'altissima resa del DNA di nostro interesse. Il fattore di amplificazione sarà  $2^n \times 2$ .

Il processo di PCR avviene all'interno di un termociclatore, dove abbiamo un controllo selettivo della temperatura e del numero di giri.

La PCR può essere applicata a diversi aspetti e protocolli sperimentali:

### 1) CLONAGGIO e MANIPOLAZIONE GENICA

Possiamo amplificare i frammenti con i siti di restrizione richiesti, per avere una grande quantità di frammenti con le estremità compatibili con quelle con cui è stato tagliato il vettore. I primer utilizzati devono avere una serie di caratteristiche. Devono essere compatibili all'estremità 3'-OH, ma possiamo avere al 5' delle sequenze non complementari al DNA target. In questo modo, utilizzeremo i chiamati PRIMER CON LE ALI, che contengono al 5' delle sequenze palindromiche non complementari al target, riconosciute però da enzimi di restrizione. Aggiungo anche delle basi aggiuntive che aumentano l'efficienza di taglio. I primer con le ali hanno una lunghezza maggiore rispetto ai primer normali appaiati, che sono lunghi 18 pb.

I primer con le ali sono composti circa da:

- 6 basi del sito di taglio

- 2/4 basi aggiuntive

- sito complementare all'estremità del DNA template. Questa porzione avrà differente lunghezza in base alla tipologia di template, se è genomico o plasmidico.

Gli step della PCR sono sempre gli stessi e ottengo alla fine un frammento che porta alle estremità un sito riconosciuto da enzimi di restrizione. Devo però eliminare il template per clonare in vivo quello che ho amplificato, questo procedimento varia a seconda della tipologia di DNA che sto trattando:

- DNA GENOMICO: utilizzo un'elettroforesi su gel di agarosio come tecnica preparativa, quindi l'amplicone migra in funzione del suo peso molecolare e della sua lunghezza, mentre il DNA genomico rimane nella parte apicale del gel.

- DNA PLASMIDICO: Il sistema di restrizione Dnpi riconosce la sequenza GATC metilata dal sistema dam. Il plasmide con il target è stato metilato con levata frequenza dal sistema dam, mentre l'amplicone no, dunque non viene tagliato e si elimina così solo il template.

IN BASE A COME HO DIGERITO IL PLASMIDE E A CHE TIPO DI PLASMIDE HO, VALUTO COME TRATTARE L'AMPLICONE!!!!

La Taq e la Vent hanno un'attività terminal transferasica intrinseca, sono in grado quindi di fare TA cloning, aggiungendo A all'estremità 3'-OH. Questo è fondamentale quando utilizziamo dei plasmidi, come pCR, che sono già tagliati e hanno dei polilynker con delle estremità protruding.

### 2) CARATTERIZZAZIONE DEI RICOMBINANTI BATTERICI

Permette di fare un'analisi del DNA plasmidico già ricombinato in vivo, ma è necessario poi fare un mappa di restrizione, per valutare le dimensioni effettive del campione.

#### SONDE

Le sonde sono delle sequenze di acido nucleico che presentano una sequenza complementare a quella da identificare: esse si utilizzano infatti per la ricerca di specifici tratti di DNA o RNA.

L'associazione avviene in modo sequenza-specifico, tramite la metodica dell'ibridazione, che porta alla formazione di un ibrido tramite dei legami a idrogeno. L'ibrido può essere DNA-DNA, RNA-RNA o RNA-

DNA. L'ibridazione può avvenire anche tra filamenti non totalmente complementari. E' molto importante valutare le condizioni sperimentali.

La sonda può essere sintetizzata a partire da un plasmide con cDNA o DNA, da un amplicone ottenuto per PCR o da un oligonucleotide, tramite il processo di guesmer, sfruttando il codice genetico.

Le sonde a DNA possono essere di due tipologie:

### 1) SONDE RADIOATTIVE

Le sonde radioattive a DNA possono presentare delle marcature terminali, come marcature al 3' o al 5', oppure delle marcature di sintesi, come nei processi di nick traslation e random priming.

Nella marcatura terminale al 3' e nelle due marcature di sintesi, il fosfato freddo viene sostituito da un fosfato marcato radioattivamente con  $^{32}$ P in alpha, mentre nel caso della marcatura al 5', viene sostituito in posizione gamma.

In tutti i casi abbiamo bisogno di un donatore di un nucleotide trifosfato marcato radioattivamente. Alla fine di ogni maractura, possiamo misurare l'incorporazione: quanto DNA freddo siamo riusciti a marcare, quindi quanto DNA radioattivo abbiamo ottenuto. L'attività specifica di una sonda si misura facendo il rapporto tra la sonda marcata e il DNA freddo ed essa stima la sensibilità di una sonda, che appunto dipende dall'acquisizione di DNA radioattivo. Un'alta attività specifica, quindi un'alta sensibilità permettono di rilevare qualcosa anche a livelli bassi. La specificità, invece, dipende dalla sequenza della sonda e dalle condizioni in cui facciamo avvenire l'ibridazione con il target.

Il rilevamento del segnale viene attuato tramite un'autoradiografia, grazie appunto alla presenza di una sostanza radioattiva, che impressionano la lastra per emissione di particelle beta.

La marcatura al 5' prevede la defosforilazione del templatato tramite una fosfatasi alcalina e l'inserimento di un fosfato radioattivo, grazie alla polinucleotide chinasi, che lo aggiunge all'estremità 5' in posizione gamma.

Questa sonda non è molto sensibile, data la sua bassa attività specifica.

La marcatura al 3' coinvolge la terminal transferasi, che è un enzima che non necessita di uno stampo da copiare, ha attività polimerasica al 5'-3', ma ha bisogno di un primer al 3'-OH. Si aggiungono uno o due nucleotidi trifosfato marcati in alpha, per questo, anche in questo caso, non abbiamo un'attività specifica molto elevata.

Se utilizziamo come punto di partenza un double strand DNA, amplificato per PCR, facciamo delle marcature di sintesi.

La nick traslation prevede un trattamento del dsDNA con una DNAasi, in modo equivalente a quello che succede nella replicazione per formare il primer, da parte della primasi. Si genera così un frammento 5'-3', la cui estremità 3'-H può essere riconosciuta dall'oloenzima, che aggiunge in direzione 5'-3' i nucleotidi trifosfato marcati in alpha. In questo caso, abbiamo un'attività specifica maggiore.

La random priming prevede l'utilizzo del frammento di Klenow e di un dsDNA di cui non si conosce la sequenza. Si aggiunge quindi questo templatato a una miscela di sei esanucleotidi, che presentano tutte le possibili combinazioni di basi, avendo così  $4^6$  tipologie di primer possibili.

Denaturato il DNA, lo inserisco in questa miscela e utilizzo il frammento di Klenow, che ricordiamo non ha attività esonucleasica di nick traslation 5'-3'. Aggiungo poi  $Mg^{2+}$  e i nucleotidi marcati in alpha. L'attività specifica, anche in questo caso, è relativamente alta.

Per quanto riguarda le sonde marcate radioattivamente, possiamo individuare anche una tipologia di sonda basata sull'RNA, la RIBO PROBE.

Esse sono sonde radioattive a RNA, che si ottengono per trascrizione in vitro e si utilizzano dopo aver clonato il gene d'interesse o un cDNA (LIBRERIE A CDNA E SCREENING!!!!) all'interno di un vettore.

La T7 e la SP6 sono posti ai lati dei polilynker nel plasmide pGEM-7Zf e sono i promotori per specifiche RNA fagiche, molto processive. Aggiungiamo il dsDNA a una soluzione contenente i nucleotidi trifosfato marcati in alpha, il  $Mg^{2+}$  e le polimerasi fagiche, otteniamo in questo modo ssRNA, ovvero il trascritto di uno dei due strand in base al promotore utilizzato.

L'attività specifica in questo caso è molto alta.

### 2)SONDE NON RADIOATTIVE

In questa tipologie di sonde, il DNA non è maracto radioattivamente, ma presenta un legame con un

gruppo marcatore, come la fluoresceina, la biotina e la digossigenina. La marcatura può avvenire in modo diretto, quindi con un legame tra nucleotide e fluorocromo, che comporta all'emissione e alla rilevazione diretta del segnale luminoso, oppure indiretta, in cui per esempio, il complesso biotina-streptavidina è riconosciuto da anticorpi marcati con fluorocromi o con enzimi che producono chemiluminescenza. Il marcatore si lega alla base, per evitare di intromettersi con i residui coinvolti nell'ibridazione.

La DNA polimerasi viene modificata per evitare di distinguere tra un nucleotide modificato e uno non. Anche in questo caso si usano tecniche di nick traslation e di random priming, per fornire e legare i nucleotidi marcati.

Per la marcatura indiretta, dobbiamo rilevare il segnale mediante una serie di processi, ovvero tramite l'utilizzo di una Southern e Northern analysis, a fine di ottenere delle bande nette. La molecola utilizzata deve essere bifunzionale: deve sia riconoscere il marcatore, che dall'altro lato legarsi a un fluorocromo o a un enzima che fa chemiluminescenza.

### SOUTHERN ANALYSIS

La southern è una metodica che permette di rilevare la presenza di specifiche sequenze di DNA in una miscela complessa, in cui il DNA è fissato su un supporto. Sperimentalmente si procede nel seguente modo:

- 1) si utilizza un campione eterogeneo di DNA, viene trattato con enzimi di restrizione, ottenendo delle digestioni complete.
  - 2) i frammenti vengono sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio, osservando la migrazione di essi in funzione del loro rispettivo peso molecolare
  - 3) il gel viene colorato con un intercalante, come il bromuro di etidio, e viene visualizzato al transilluminatore.
  - 4) successivamente, denaturò il DNA, per avere un single strand. Lo introduco in una soluzione alcalina di NaOH.
  - 5) aggiungo poi un filtro di nitrocellulosa o di nylon in modo da trasferire le bande in modo ottimale
  - 6) ottengo una copia fedele del gel sul filtro, lego ulteriormente il filtro al gel, sottoponendo il campione a raggi UV, per formare con cross-linking dei legami covalenti tra DNA e filtro.
  - 7) faccio ibridazione con la sonda, generalmente la attuo a 50% di formammide, a una temperatura di 42 gradi stringente o di 35 gradi non stringente
  - 8) incubazione con la sonda
- !!se ho una sonda radioattiva, è necessario, come nella western, fare un blocking con sperma di salmone, per saturare i siti aspecifici!!
- 9) rilevazione del segnale: nel caso di una sonda radioattiva, ottengo delle bande nette su una piastra autoradiografica, mentre nel caso di una marcatura non radioattiva, possiamo fare l'esempio della marcatura con digossigenina. Devo aggiungere alla soluzione una molecola bi-funzionale, che sia in grado di essere riconosciuta da anticorpi, legati a un substrato come fosfatasi alcalina o perossidasi, oppure da enzimi che fanno chemiluminescenza in presenza di un substrato cromogeno. La southern viene utilizzata per la diagnostica, la misura delle estremità telomeriche, DNA finger printing e per elaborare la mappa di restrizione del genoma.

### NORTHERN ANALYSIS

Tecnica basata sull'ibridazione, in cui il target di RNA, oppure solo di mRNA, è posto su un supporto. Questa metodica è utilizzata per definire il peso molecolare degli RNA oppure per identificare l'avvenimento di splicing alternativi. Sperimentalmente si procede nel seguente modo:

- 1) utilizziamo un ssRNA, che viene estratto tramite l'utilizzo di specifiche soluzioni tampone, viene dosato allo spettrofotometro e non viene frammentato.
- 2) devo far sì che l'RNA migri solo in funzione del suo peso molecolare e non della sua forma, quindi devo denaturarlo, per mantenere delle strutture lineari. La denaturazione avviene ad alte temperature e con formammide.
- 3) faccio elettroforesi su gel di agarosio e una colorazione con bromuro di etidio, per visualizzare la corsa elettroforetica. Gli rRNA compongono ben il 90% dell'RNA totale, ottengo quindi delle bande discrete su gel di agarosio, una corrispondente al 28s e una al 18s. Questo è utile per definire la bontà della

purificazione, infatti la banda 18s deve essere circa la metà d'intensità rispetto alla banda 28s.

4)trasferisco il gel con le bande su un filtro di nitrocellulosa o nylon, senza l'aggiunta di soda, perchè l'RNA viene idrolizzato in condizioni basiche.

5)crosslinko con UV per formare i legami covalenti

6)ibridazione con una sonda, ottenuta per ribo probe (devo però sapere il senso di trascrizione) o random priming (con successiva denaturazione).

Se voglio attuare una purificazione completa, cercando di rilevare solo mRNA, che compone solo il 5% dell'RNA, sfrutto le code di poli-A di cui si compongono gli mRNA. Esse vengono riconosciute da code di poli-T, posizionate insieme a sfere magnetiche o su resine di supporto. Otterrò una buona purificazione, se sul gel di agarosio, non osservo nessuna banda relativa agli rRNA, ma comunque otterrò uno smearing, quindi non una banda ben visibile, perchè la miscela di mRNA è composta da mRNA di differenti dimensioni.

### LIBRERIE GENOMICHE

Le librerie genomiche sono costituite da frammenti di DNA eterologo clonato, che nel complesso sono rappresentativi dell'intero genoma, sia dei geni espressi, che non.

Esse quindi devono contenere almeno una copia di tutte le possibili sequenze. La caratteristica di essere ridondante implica il fatto di dover fare screening, dato che posso avere molteplici copie rappresentative di alcune sequenze.

Dunque, una libreria genomica è un insieme di cloni ricombinanti, che vengono clonati all'interno di un vettore ospite, che può essere fagico o plasmidico. La scelta del vettore dipende dalle dimensioni del genoma di partenza. Il genoma deve essere reso clonabile, tramite la digestione con enzimi di restrizione II. Quindi, in modo schematico devo avere: un frammento, clonato in un vettore, ottenendo un plasmide ricombinante e devo poi trasformare E.Coli, con la successiva formazione di colonie, che porta all'amplificazione in vivo del frammento.

I frammenti sovrapposti sono fondamentali nelle librerie genomiche. Essi derivano dalla frammentazione casuale del genoma, che permette poi l'assemblaggio dei vari geni e la rappresentazione dell'intero genoma. Essi sono cloni ibridati da una stessa sonda, che copre le porzioni adiacenti a ogni frammento. Questo porta alla conoscenza dell'intero genoma nell'ordine corretto. I frammenti sovrapposti derivano da digestioni parziali in condizioni limitanti di enzima rispetto al substrato. I siti di restrizione non sono distribuiti in modo uniforme nel genoma, quindi le dimensioni medie dei frammenti, ricavati dalle digestioni parziali, possono essere analizzate su gel di agarosio: avrò frammenti più piccoli alla base del gel. L'enzima di restrizione quindi non taglia tutte le possibili sequenze di riconoscimento: otterrò una collezione randomizzata e poi farò una selezione dei frammenti delle dimensioni che mi servono tramite elettroforesi.

Il vettore si deve presentare in forma linearizzata, per questo, anche in questo caso, faccio un'elettroforesi su gel. Devo anche rendere E.Coli competente alla trasformazione e devo valutare la qualità della libreria, piastrando in condizioni selettive. Devo valutare la percentuale di cloni che contengono gli inserti e se le dimensioni degli inserti sono paragonabili a quelle attese.

### SCREENING

Lo screening è il processo mediante il quale posso identificare il clone che contiene la sequenza d'interesse, all'interno di una libreria genomica o a cDNA.

In primis, devo valutare il titolo della banca primaria, quindi il numero di colonie o placche fagiche/mL. In questo modo sono a conoscenza di quante colonie o placche fagiche ottengo piastrando tot mL di soluzione. Per calcolare il titolo, devo prelevare un'aliquota di campione, faccio delle diluizioni seriali, piaastro e conto le colonie ottenute. Le dimensioni e la complessità della library dipendono dalla grandezza del genoma e dalle dimensioni dei frammenti. Da questo dipende il numero di cloni per avere una ragionevole rappresentatività di tutto il genoma. Tuttavia, questo è impossibile da garantire, quindi approssimo il numero di cloni indipendenti che una libreria deve avere per avere una buona probabilità che la mia libreria contenga il gene d'interesse. La stima viene fatta attraverso la formula  $N = \ln(1-)/\ln(1-/G)$ . In funzione del genoma di cui abbiamo fatto la banca, definiamo le dimensioni medie del frammento, quindi il numero di cloni da saggiare per avere una buona probabilità di ottenere il nostro frammento

d'interesse.

Lo screening in base alla sequenza nucleotidica, che è quello più utilizzato, viene fatto mediante il processo di colony hybridation, quindi uno screening primario.

1) piastramento della library su piastre ordinate e numerate, utilizzo dei filtri di nylon o nitrocellulosa per trasferire le colonie

2) faccio crescere le colonie a 37 gradi

3) devo ottenere DNA single strand, quindi denaturo con la soda

4) crosslinko con Uv, per creare legami covalenti tra filtro-DNA

5) aggiungo la sonda, marcata generalmente per random priming

6) rilevo il segnale in autoradiografia o per marcatura a fluorescenza

7) risalgo poi a partire dal filtro, alla posizione della colonia, estraggo poi il DNA, faccio la mappa di restrizione.

E' necessario poi attuare uno screening secondario, per aver un segnale puro.

1) prelevo la colonia/placca, la faccio crescere su terreno liquido, facendo comunque una crescita separata per le singole colonie

2) piastra

3) ricerco la sequenza

4) arricchimento della piastra. Ottengo un maggior numero di segnali rispetto al segnale primario, sempre in modo proporzionale alla purezza della colonia.

Attuo poi uno screening terziario.

Ogni segnale viene poi fatto crescere, estraggo il DNA e faccio la mappa di restrizione.

La sequenza identificata viene utilizzata da una sonda per screenare tutta la banca e isolare altri cloni.

In questo modo faccio "chromosome walking", per risalire alla sequenza genomica completa.

### LIBRERIE A cDNA

Le librerie a cDNA rappresentano tutto il trascrittoma o quello relativo a una parte, che da origine a proteine. Dipende, il trascrittoma, dalla tipologia di cellula, di tessuto e dalle condizioni in cui si estrae l'RNA. L'RNA e l'mRNA, a oggi, non si possono clonare direttamente, è necessario quindi produrre cDNA. Si va quindi a formare una copia complementare attraverso l'azione della trascrittasi inversa, tramite random priming si va a formare l'innesto al 3'-OH e per la riparazione delle parti non associate, si utilizza la T4 ligasi.

Se voglio ottenere una libreria a cDNA contenente solo mRNA, sfrutto la coda di poliA e costruisco un innesto fatto da poli-T, che anila in modo specifico alle code dell'mRNA. I primer che si generano sono in quantità non eccedenti rispetto al substrato: utilizzo degli oligoDT ancorati, che si posizionano dopo 12-18 timine e in 3'-OH vengono messe due o tre basi in più che rappresentano tutte le combinazioni di basi possibili. Avviene quindi un'anilazione preferenziale all'inizio della coda di poli-A, non su tutta la sequenza.

Come ottengo dal double strand cDNA-RNA, un dsDNA

1) PRIMO METODO

-elimino l'RNA usato come stampo, tramite l'azione limitata della RNasi H

-in vitro, l'estremità 3'-OH del cDNA fa un loop, quindi questa porzione viene usata come primer dalla polimerasi per sintetizzare, usando come stampo lo stesso cDNA. La DNA polimerasi usata è la T7, molto processiva, perchè deve copiare cDNA di differenti lunghezze.

2) SECONDO METODO

-RNasi H viene usata non in eccesso, ma in condizioni limitanti, tanto da lasciare dei piccoli frammenti di RNA sul cDNA che fungono da primer al 3'-OH per l'oloenzima di E.Coli.

3) TERZO METODO

-rimozione totale dell'RNA per mezzo dell'azione dell'RNasi H

-la terminal transferasi polimerizza nucleotidi in funzione di quelli che ho aggiunto in vitro al 3'-OH

Devo poi render eclonabile il double strand. Utilizzo degli adattatori, ovvero delle molecole sempre double strand con estremità coesive. Esse vengono aggiunte al cDNA e ligate.

Esistono in commercio anche dei linker, che contengono dei siti di restrizione e basi aggiuntive,

necessarie per il taglio. Essi sono legati alle estremità del cDNA da delle ligasi. Questi linker devono essere tagliati da enzimi di restrizione. Per sicurezza, dato che non conosco la sequenza del double strand e se ci sono altri siti di restrizione all'interno, aggiungo delle metilasi al dsDNA prima di linkare, proteggendo così la sequenza interna al dsDNA, ma permetto comunque il taglio degli enzimi di restrizione.

Le banche a cDNA vengono costruite a partire dal vettore fagico lamdagt10, che presenta un sito di clonaggio per EcoR1 all'interno del repressore, che blocca così il ciclo litico a favore di quello lisogeno. Dopo l'allestimento della banca, per risalire a una sequenza specifica clonata all'interno di cDNA, si ricorre al processo di screening, che è analogo al genomico. Dopo lo screening posso creare sonde a RNA oppure posso risalire al peso molecolare di una molecola di RNA.

Partendo da RNA possiamo anche fare RT-PCR, quindi posso identificare la presenza di un RNA in una miscela complessa. Tramite l'utilizzo di una retrotrascrittasi specifica, dall'RNA risalgo al cDNA che presenta un primer specifico per un determinato gene, quindi devo conoscere la sequenza target, ottenendo poi la double strand RNA-cDNA.

Segue poi una PCR specifica, che mi permette di amplificare il segnale riconducibile a uno specifico RNA, per verificarne la presenza.

### BANCHE AD ESPRESSIONE

Da una sequenza di mRNA si può risalire a una proteina o a un determinante antigenico di quella stessa proteina, riconosciuto tramite screening con anticorpi.

Per ricavare la sequenza che produce una data proteina, il cDNA deve essere trascritto e tradotto, dunque è necessario avere un promotore riconosciuto dal sistema.

Il vettore utilizzato per questo processo è generalmente il fago lamdagt11, che ha sostituito tutti i geni per la lisogenia, con il gene LacZ, un promotore endogeno e viene inserito per mutagenesi un sito al 3' di LacZ, che viene riconosciuto da EcoR1. L'assemblaggio per packing in vitro è consentito e si vanno a formare particelle fagiche funzionanti. Il sistema è stato modificato al fine di indurre l'espressione del vettore fagico:

- lamdagt11 contiene un promotore con la regione -35 modificata per renderlo indipendente dalla catabolite repression

- E.Coli presenta le estremità -10 e -35 del gene codificante per il repressore, per evitare il sistema leaky, identiche alle sequenze consenso

E.Coli viene quindi piastrato in vitro in presenza di glucosio, viene aggiunta X-Gal e IPTG e viene così indotta l'espressione del genoma fagico, ottenendo una beta-gal funzionante e delle colonie blu.

Dato che però voglio ottenere una proteina di fusione, il clonaggio lo attuo all'estremità C-terminale, in questo modo viene modificata l'espressione della beta-gal, che non sarà più funzionante. Ottengo una proteina di fusione beta-gal-X, che produrrà delle colonie bianche su piastra.

Ho clonato tagliando con EcoR1, quindi il cDNA può entrare in un senso o nell'altro, ma se viene clonato con il frame originale e nel senso originale, la parte C-terminale della proteina di fusione, corrispondente alla proteina target, che può essere riconosciuta da anticorpi, e tramite screening possiamo aver un segnale. Infetto poi E.Coli e faccio crescere, successivamente valuto la qualità della banca, osservando il numero di colonie bianche prodotte. Se è buona, faccio titolo della banca primaria e amplifico.

Successivamente piaastro, favorisco una crescita a 37 gradi, dove il fago si replica. Utilizzo poi filtri con IPTG, per indurre la produzione di una proteina di fusione, a T di circa 42 gradi. La produzione di proteine di fusione viene indotta senza lisi cellulare.

Successivamente, attuo un'immunodecorazione, saturando con BSA o latte, aggiungendo anticorpo secondario. Faccio poi una serie di lavaggi, rilevando poi il segnale. Identifico così il fago che produce la mia proteina d'interesse. La estraggo e l'analizzo con SDS page, utilizzo come controllo la proteina estratta in assenza di IPTG, che non dovrebbe contenere la proteina di fusione. Successivamente, coloro con Blu di comassie, identifico una banda corrispondente alla proteina specifica, che avrà peso molecolare maggiore della beta-gal. Estraggo, faccio la mappa di restrizione per definire le dimensioni del cDNA e per sequenziare.

### SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento di SANGER è alla base di tutte le metodiche di sequenziamento automatizzate che utilizziamo oggi. Si basa su una sintesi in vitro di DNA.

Quali sono i fattori fondamentali utilizzati nel metodo Sanger?

#### 1)DNA STAMPO

Un DNA single strand, che può essere ottenuto clonando all'interno di vettori che permettono la sintesi di un single strand (come M13), tramite DNA amplificato per PCR o per trasformazione in vivo, ma poi denaturato.

#### 2)PRIMER

Sono oligonucleotidi complementari alla regione a monte della sequenza che si vuole ottenere

#### 3)ddNTPs

Sono nucleotidi trifosfati modificati, perchè contengono un'estremità 3'-H, che impedisce la formazione di un legame fosfodiesterico, quindi interrompono la sintesi a livello di qualsiasi nucleotidi, permettendo la formazione di frammenti che differenziano solo per un nucleotide.

#### 4)DNA POLIMERASI

Deve avere:

- alta processività
- alta velocità di reazione
- scarsa attività 3'-5' di proofreading
- assente attività 5-3' di nick traslation

#### 5)PIROFOSFATASI , che eliminano i gruppi pirofosfato in eccesso, che si formano durante le reazioni di polimerizzazione ad alta velocità

Si allestiscono 4 provette, in cui viene messa la stessa quantità di reagenti, quindi di DNA, DNA pol, Mg<sup>2+</sup>, primer e i 4 nucleotidi. Si aggiungono in ogni provetta un ddNTPs differente.

Le quantità sono inserite in modo tale che l'incorporazione del ddNTPs è casuale e non presenta vantaggio rispetto ai normali nucleotidi. Si ottengono tutti i possibili frammenti che partono dallo stesso punto, ovvero dove è posizionato il primer, e terminano con un certo ddNTPs.

Per l'analisi del set di frammenti ottenuti, utilizzo un'elettroforesi su gel di poliacrilammide o capillare. I nucleotidi ddNTPs sono marcati radioattivamente oppure per fluorescenza, quindi la rilevazione del segnale avviene in due modi differenti. Nelle marcature radioattive, si utilizza o il <sup>32</sup>P, che produce radiazioni beta ad alta energia, ma ha un decadimento molto tempestivo, dura solo 10 giorni, oppure il <sup>35</sup>S, che produce sempre raggi beta, ma a minore energia e ha un'emivita più lunga. Possiamo osservare il gel con autoradiografia. Nel caso delle marcature a fluorescenza, leghiamo al 5'P, al ddNTPs o al dNTP, un fluoroforo, in grado di assorbire a una certa lunghezza d'onda e di emettere a una lunghezza d'onda superiore, quindi con minor energia. Il processo è gestito da un laser, che deve leggere le singole bande, che emetteranno fluorescenza e da un sistema di acquisizione, che leggerà le varie sequenze rilevate. La marcatura può esser one-dye, quindi i ddNTPs sono marcati con lo stesso fluorocromo, oppure four-dye, quando la marcatura avviene con quattro fluorocromi differenti. Si utilizza poi un gel di poliacrilammide, in cui la corsa elettroforetica supera il rilevatore di fluorescenza, viene così identificato il segnale fluorescete emesso da ciascuna banda e vengono inviati i dati al sistema del rilevatore, che ci da la sequenza in uscita. Otteniamo un elettroferogramma, in cui ogni picco corrisponde a un nucleotide. Esistono altre tecniche di sequenziamento, che non si basano sul metodo Sanger. Si chiamano NGS. Non utilizzano un gel di poliacrilammide, il DNA genomico è frammentato, non viene effettuato un clonaggio e rileviamo subito il segnale in modo automatizzato.

Abbiamo l'amplificazione di un single strand legato a un adattatore, che permette di legare i singoli frammenti su dei supporti, diversi a seconda delle metodiche.

Anche in queste metodiche, abbiamo una PCR in vitro per amplificare il frammento. Dato che ho degli adattatori, conosco le sequenze alle estremità e posso attuare il processo di PCR, che non avviene però in modo convenzionale: per esempio a seguito del pirosequenziamento, devo attuare una PCR ad emulsione oppure a seguito di LUMINA, faccio una PCR a ponti di solfuro.

#### 1)PIROSEQUENZIAMENTO

Avviene il rilevamento del pirofosfato liberato a seguito dell'attacco di un ddNTPs al filamento

polimerizzato. Il DNA è fissato su delle sferette e il processo si ripete mediante tre passaggi, che vengono attuati in modo ciclico.

1) incubazione del single strand insieme ai primer adeguati, alle DNA polimerasi, all'ATP, alla fosforilasi, luciferasi e apirasi e ai substarti luciferina e ASP.

2) aggiungo gradualmente un nucleotide, che può risultare essere complementare oppure no.

L'incorporazione avviene solo se è complementare, in caso contrario viene eliminato dall'apirasi. Il pirofosfato e l'altro fosfato vengono utilizzati per sintetizzare ATP, per azione della pirofosfatasi.

3) L'ATP viene usata per catalizzare l'altra reazione, tra luciferasi e luciferina, che viene ossidata, producendo un segnale luminoso.

Dunque  $1 \text{ nucleotide} + 1 \text{ pirofosfato} = 1 \text{ ATP} = 1 \text{ fotone}$ .

4) ripeto il ciclo e rilevo poi il segnale tramite una fotocamera specifica a CCD. Il segnale è proporzionale all'ATP prodotta e quindi al nucleotide inglobato. Se ottengo un picco doppio, avrò ottenuto l'incorporazione di due nucleotidi uguali consecutivi; se ottengo un picco solo, avrò l'incorporazione di un nucleotide, mentre se non ottengo alcun picco, significa che non ho avuto nessuna incorporazione e quindi non rilevo nessun segnale.

## 2) ILLUMINA

Utilizzo degli adattatori legati a un supporto, complementari a un'estremità del double strand. Viene indotto poi un appaiamento con l'altro adattatore, corrispondente all'oligonucleotide posto sull'altra estremità del DNA. Avviene poi una sintesi e una denaturazione del double strand, ottenendo due filamenti appaiati in modo covalente agli adattatori alla base. Questo processo si ripete in modo ciclico, fino ad avere numerose copie del single strand. Il sistema automatizzato e implementato sarà in grado di individuare le sequenze e allinearle.

La mutagenesi è il processo di mutazione e manipolazione genetica, attraverso la quale viene alterata la sequenza codificante di un gene clonato e quindi della proteina da esso codificata.

La mutagenesi può essere:

### LOCALIZZATA

Avviene la manipolazione di un sito di restrizione con nucleasi S1. Genero estremità blunt tramite la rimozione, per l'attività nucleasica della nucleasi S1. In questo modo ho ottenuto un sito, all'interno del gene, modificato in una posizione specifica.

Le mutazioni per sostituzioni di basi vengono inserite per l'azione di mutagenici chimici, che portano all'incorporazione di analoghi delle basi, producendo così un accoppiamento errato tra le basi. Per esempio il Bisolfito di Sodio ha come bersaglio le C, che diventano U, mentre Anitroso ha come bersaglio le A e le G.

### RANDOM

L'introduzione di mutazioni randomizzate viene effettuata grazie a processi di PCR attuati con polimerasi che non hanno attività esonucleasica di proof-reading, come la Taq oppure giocando sulle quantità di  $Mg^{2+}$ , sul numero di cicli e sulle temperature di annealing.

### SITO SPECIFICA

Con la PCR, posso introdurre mutazioni in punti specifici della sequenza. Nel caso dell'introduzione di mutazioni puntiformi, vado a creare dei primer mutagenici, nel processo di quick change.

Utilizzo del DNA denaturato, su cui i primer mutagenici si appaiano su entrambi gli strand. Utilizzo un enzima che lascia estremità blunt e che non ha una buona attività di nick translation. Trasformo poi E.Coli, aggiungo Dnp, che riconosce il sito GATC metilato ed elimina il template. Ottengo così un plasmide mutagenico.

