

LEZIONE 2

Estrazione con fenolo cloroformio: creano le due fasi che permettono di estrarre il DNA (è un'ulteriore purificazione) e poi viene la precipitazione con etanolo. Mi trovo come precipitato il DNA poi risospeso con il TE: in realtà non è quello che si fa oggi nei laboratori di ricerca.

Oggigiorno esistono dei kit commerciali che fanno la stessa cosa con resa maggiore e in minor tempo. Abbiamo la purificazione con colonnine di silice: la prima parte è uguale, ma al posto del fenolo cloroformio e etanolo, si usano le colonnine che contengono dei gruppi ossidrilici che sono esposti all'esterno della resina: nella situazione in cui ho una soluzione salina molto concentrata, il DNA si lega attraverso i ponti salini agli ossidrili della silice, quindi il DNA si lega alle colonne di silice. A questo punto si fanno dei lavaggi che non staccano il DNA dalla resina per pulire dai contaminanti, e infine con una soluzione a bassa forza ionica che staccano il DNA dalla colonnina, potendolo recuperare sul fondo della provetta.

Enzimi utilizzati nella manipolazione degli acidi nucleici

Sono diversi tipi, divisi per classi:

- Polimerasi (RNA e DNA polimerasi)

Enzimi che polimerizzano, creano delle catene di nucleotidi, le doppie e singole eliche ecc.

- Enzimi di modificazione (fosfatasi, chinasi, ligasi - unisce ecc.)

Enzimi che modificano gli acidi nucleici dal punto di vista dell'alterazione della struttura chimica degli acidi nucleici

- Nucleasi (esonucleasi - dall'estremità - ed endonucleasi - all'interno)

Enzimi che tagliano il DNA

- Enzimi di restrizione

Sono sempre endonucleasi ma è una categoria estremamente importante perché invece di farlo in siti casuali, tagliano il DNA in corrispondenza di sequenze ben specifiche.

(Carrellata veloce degli enzimi)

POLIMERASI

Templato dipendenti molto spesso: prendono un templato (filamento singolo che contiene nucleotidi) creano un filamento complementare e creando un legame tra l'OH in 3' e il fosfato in 5'. Ovviamente complementari (C-G A-T)

Questi enzimi, oltre l'attività polimerasica, hanno anche attività addizionali - attività esonucleasica (in direzione di polimerizzazione o al contrario - 3' → 5'). È ciò che permette alle polimerasi di avere un'alta affidabilità: se aggiunge un nucleotide sbagliato infatti possono rimuoverlo e sostituirlo con quello corretto.

Si utilizzano le polimerasi di batteri o batteriofagi (virus che attaccano batteri)

Trascrittasi inversa e Taq Polimerasi.

DNA POLIMERASI 1 DI E.COLI

È una singola catena, molto grande, questa polimerasi possiede entrambe le attività esonucleasiche ma è molto meno attiva rispetto a quelle dei batteriofagi. Le applicazioni in laboratorio sono molteplici: marcatura dei terminali (si usa un frammento di Klenow: stessa polimerasi 1 in cui è stato tolto il dominio: è infatti più piccola (il 70%) per far sì che il frammento conserva l'attività in direzione 3'-5', ma non il 5'-3', così è più semplice da usare e più economico).

Usiamo questa polimerasi per la Nick Translation: usato per creare sonde radioattive, seguendo la radioattività era possibile capire dove fosse il materiale genetico.

Prevede la creazione di un nick (quindi una rimozione di una parte di uno dei due filamenti), la rimozione, la sostituzione e attraverso l'utilizzo della polimerasi, si aggiungevano dei nucleotidi marcati (fosforo radioattivo) che la polimerasi aggiungeva al posto degli originali. Ad oggi ci sono tecniche che hanno abbandonato i composti radioattivi.

TAQ POLIMERASI

Ha la particolarità di essere la polimerasi di un termofilo, quindi riesce a resistere al calore (60-70°) molto termostabile (non perde conformazione o abilità). Alla base della PCR (una delle tecniche più importanti)

Finora sono tutte templatato dipendenti (avevano un filamento stampo), ne esistono eprò templatato indipendenti: non avendo un templatato la sequenza dei nucleotidi è ovviamente casuale, però se io fornisco un unico nucleotide, crea una catena di quel singolo nucleotide. Questo enzima viene utilizzato per aggiungere nucleotidi tutti uguali (code ecc.)

TRASCRITTASI INVERSA

È un enzima che trascrive dall'RNA al DNA: i retrovirus hanno infatti un genoma composto da RNA e hanno la capacità di copiarlo a DNA, così da integrarsi nel genoma di una cellula ospite e infettarla. Retrovirus più famoso: HIV. Utili per la creazione di cDNA.

Retrovirus come AMV e MMLV hanno trascrittasi inverse che sono enzimi multifunzionali, ma sono usate principalmente come "DNA polimerasi dipendenti da RNA".

RNA POLIMERASI DEI FAGI

L'RNA è instabile, ma esistono dei casi in cui vengono utilizzati Rna polimerasi dai fagi.

Se abbiamo un RNA templatato, l'RNA polimerasi sintetizza un filamento singolo complementare.

Queste RNA sono molto utilizzate invece in vivo, perché si creano dei sistemi che prevedono la sintesi di un RNA esogeno all'interno della cellula, utilizzate quindi per la produzione di proteine ricombinanti.

DNA LIGASI

Enzimi di modificazione, si occupa di saldare le interruzioni tra i filamenti. Catalizza la formazione dei legami fosfodiesterici tramite uso di ATP. Può unire sia interruzioni su un filamento che due filamenti, lega anche sequenze terminali omologhe e coesive (cioè c'è un'interruzione sui filamenti in due punti diversi - uno dei due filamenti di DNA presenta nucleotidi non appaiati e sporgenti che tendono ad appaiarsi - le estremità piatte hanno invece tagli netti).

La ligasi unisce il prodotto finale.

Ne esistono di due tipi:

-DNA ligasi di Escherichia Coli

Svantaggio: non è in grado di unire estremità piatte in vitro, ma solo coesive e ha bisogno di NAD che va aggiunto.

-DNA ligasi del fago T4

Lega sia frammenti piatti che coesivi e non ha bisogno di cofattori.

FOSFATASI E CHINASI

Le fosfatasi toglie il fosfato. Principalmente si usano BAP(fosfat o CIP(dall'intestino di vitello). Entrambi gli enzimi catalizzano l'idrolisi di residui di 5'-P.

In alcuni casi bisogna usare condizioni di reazione leggermente diverse, ma non variano tanto.

Fase del clonaggio - fosfatasi alcalina.

Le chinasi non ne discutiamo perché quasi nessuna reazione chiede in vitro l'aggiunta di un gruppo fosfato.

NUCLEASI

ESONUCLEASI E ENDONUCLEASI

ENZIMI CHE AGISCONO SU DNA

Le più utilizzate in lab sono: esonucleasi VII, tagli le estremità sporgenti da un doppio filamento, non sono appaiati e lascia il filamento con le estremità piatte (mappatura di espressione degli introni e tecniche più complicate).

Esonucleasi III

Dalle estremità 3' digerisce i nucleotidi del filamento doppio e lascia filamenti singoli (usata per le sonde o delle delezioni unidirezionali)

Desossiribonucleasi (DNasi I)

Degradano in maniera casuale, ha come cofattore il Magnesio. Se si ha la denaturazione di un enzima si tolgono i cofattori per non permettere alle DNasi di digerire il

Crea dei nick, in posizioni casuali, ma lo stesso enzima se usa manganese taglia entrambi i filamenti - spezza il DNA in piccoli frammenti.

Quindi si usa per Nick Translation e clonaggio randomi di frammenti di DNA catalizzando il taglio sul doppio filamento.

ENZIMI CHE DEGRADANO RNA

Ribonucleasi A

Deriva da pancreas bovino

Degrada l'RNA libero in soluzione e viene utilizzata per eliminare la contaminazione dell'RNA nella purificazione del DNA.

Ribonucleasi H

Da E. Coli

Degrada l'RNA quando è sottoforma di ibrido tra RNA e DNA.

ENZIMI DI RESTRIZIONE

Endonucleasi molto specifiche, che tagliano in una posizione specifica. Alcune lasciano estremità piatte e una coesive. La maggior parte di questi enzimi riconoscono sequenze tra le 6 e le 8 basi, spesso palindromiche, che normalmente non si trovano all'interno del DNA casualmente, ciò fa sì che aggiungendola in una posizione ben precisa, posso far sì che il plasmide sia digerito in un punto specifico.

EcoR I

Lascia delle estremità coesive

Come tutti gli enzimi viene utilizzata in una condizione ideale di reazione: serie di buffer diversi, questo enzima funziona bene a pH 7.4, ecc.

Isolamento del DNA genomico

Il protocollo di isolamento e purificazione del DNA genomico dipende dall'organismo e quindi dalle caratteristiche delle cellule da cui si intende ottenerlo.

- I batteri (procarioti) sono privi di nucleo, il genoma è costituito solitamente da un singolo cromosoma presente nel citoplasma e la cellula possiede una parete cellulare.
- Nelle cellule eucariote il materiale genetico è contenuto nel nucleo e la cellula può avere la parete cellulare (cellule vegetali) o non averla (cellule animali). È più variabile rispetto a quello procariote.

Purificazione del DNA genomico da procarioti

Tutti i protocolli di purificazione del DNA genomico dei procarioti si basano sulla differenza di solubilità/comportamento in relazione alla forza ionica della soluzione del DNA genomico rispetto a quello plasmidico.

I protocolli più utilizzati prevedono inizialmente la lisi delle cellule seguita dalla

degradazione e dall'allontanamento del RNA e delle proteine per mezzo di RNAasi e proteasi ed estrazione con fenolo-cloroformio. Il DNA genomico viene quindi separato da quello plasmidico mediante precipitazione frazionata con etanolo o mediante l'utilizzo di resine a scambio anionico. (VECCHIA TECNICA)

Oggi si utilizzano tecniche che si basano sulle resine a scambio anionico, base della cromatografia a scambio anionico o cationico (separazione dei componenti di una miscela usando due fasi - stazionaria: una miscela fatta da una resina insolubile che impacca e rimane lì.

La fase stazionaria (resina) contiene gruppi carichi positivamente (ammine quaternarie). In condizioni di bassa forza ionica, il DNA con elevata carica negativa si lega per interazione elettrostatica alla resina mentre gli altri componenti neutri o carichi positivamente non si legano. Cambiando il pH o la forza ionica della soluzione si ha l'eluizione del DNA stesso. (o al contrario a seconda della carica). Usato soprattutto però nel DNA genomico.

Isolamento del RNA totale

RNA normalmente è costituito da un filamento singolo -> molto meno stabile del DNA, si degrada facilmente anche per l'azione degli enzimi ad attività RNAsica rilasciati in seguito alla lisi cellulare.

La purificazione del RNA viene condotta lavorando sempre a bassa temperatura (4 °C) e con soluzioni trattate con DEPC (dietilpirocarbonato, inibitore delle RNAsi).

Il protocollo comunemente utilizzato prevede la lisi cellulare mediante trattamento con detergenti o omogenizzazione meccanica (macinazione in azoto liquido nel caso di materiale vegetale) ed il trattamento con un TRIZOL, un composto a base fenolica in grado di inattivare gli enzimi degradativi (RNAsi) e capace di denaturare e far precipitare la maggior parte dei componenti cellulari ed in particolare le proteine ed il DNA.

Il trizol finisce di lisare le cellule, degrada proteine e fa precipitare la maggior parte del resto.

Al campione viene aggiunto cloroformio e centrifugato, ed il surnatante (fase acquosa) trattato con DNAsi per eliminare il DNA eventualmente presente.

Si effettua quindi un trattamento con la miscela fenolo-cloroformio per rimuovere ulteriormente i contaminanti ed infine l' RNA viene precipitato aggiungendo etanolo o isopropanolo. L'RNA purificato viene quindi risospeso in acqua DEPC .

Esistono anche in questo caso dei kit commerciali che si basano sull'utilizzo di resine in grado di legare l'RNA e che di solito garantiscono una resa più alta ed un prodotto finale più puro. Purifichiamo l'RNA totale per poter poi riuscire a purificare l'RNA messaggero, base per la sintesi del cDNA.

Quantificazione del DNA

Cominciamo ad analizzare i risultati della purificazione, utilizzando spettroscopia

- Direttamente da gel di agarosio: quantità minima rilevabile: circa 10 ng.
- Assorbimento a 260 nm: 1 unità di assorbanza:

DNA a doppia elica: 1 Unità assorbimento = 50ug/ml

Concentrazione DNA (ug/ml) = A 260nm x 50ug/ml

Misuriamo l'assorbanza così da sapere la concentrazione in ug/ml. Ovviamente se ci sono contaminanti, non discrimina.

Su cosa si basa la spettroscopia di assorbimento?

Un pigmento è in grado di assorbire la luce ad una certa lunghezza d'onda. Gli acidi nucleici hanno questa proprietà non nello spettro del visibile ma in quello UV (320-220 nm). Il picco di assorbimento è a 260 nm (il massimo assorbimento) - ciò è dovuto alla presenza di basi azotate. Per le proteine assorbono a 280 nm, posso quindi fare un rapporto tra l'assorbanza a 260 e una a 280. Se c'è un campione contaminato da proteine il picco tende ad alzarsi.

Per determinare la purezza del campione si calcola il rapporto tra l'assorbimento a 260 nm (DNA) e a 280 nm (proteine). In una preparazione pura questo rapporto è > di 1.7.

LEZIONE 3

Nell'interno delle cellule eucariote l'RNA che estraiamo dalla cellula è una miscela di RNA diversi (messaggero, transfer, ribosomiale, ecc.). Quello più di interesse dal punto di vista dell'informazione è l'RNA messaggero - contiene tutta l'informazione codificata dai geni. L'RNA messaggero però in realtà è molto poco nella miscela estratta (oltre l'85% è RNA ribosomiale che nella maggior parte dei casi non interessa - tutto uguale).

L'RNA messaggero contiene l'informazione d'interesse ed è particolarmente importante perché molto spesso quell'informazione non è ottenibile dal DNA, perché molto spesso nelle cellule eucariotiche sono presenti introni che compongono la maggior parte del DNA. Non contenendo informazione, è più semplice avere direttamente l'RNA messaggero.

Noi abbiamo purificato l'RNA totale.

PURIFICARE L'RNA MESSAGGERO

Il procedimento è a step:

- purificazione dell'RNA totale

- da quella miscela poi estraggo l'mRNA

esistono in realtà tecniche che permettono di isolare direttamente l'RNA messaggero dai tessuti. Questi metodi funzionano con alcuni tipi di cellule (esempio animali). Le cellule vegetali sono più fragili.

Come separo l'mRNA dal resto?

L'idea è quella di sfruttare una caratteristica dell'RNA messaggero è maturo: coda di poliadenine. TUTTE A all'estremità 3', lunga qualche centinaio di nucleotidi. Ovviamente il resto non ha questa coda di poliA. I sistemi di isolamento dell'RNA messaggero utilizzano delle sferette sintetiche (microsfere di metallo rivestite di polimero, resine attaccate ad una lunga sequenza di T, che si appaiano alle A), L'mRNA si attacca alle sfere, il metallo è ferro magnetico e attraverso un magnete teniamo le sferette attaccate alla base della provetta. A questo punto si effettuano dei lavaggi sequenziali e porto via i contaminanti (gli altri RNA) e devo separare le sfere dall'RNA semplicemente riscaldandole (termoblocco tra i 60 e 70 gradi), i legami idrogeno si rompono e sulla calamita tolgo le sferette e resto con la parte solubile: l'RNA messaggero.

Cosa faccio con l'RNA messaggero?

Vari esperimenti, ci concentriamo sulla Sintesi del cDNA. Perché? L'RNA è estremamente poco stabile (bisogna stare attenti alle contaminazioni, si degrada facilmente, ecc.). Conservare

l'informazione sottoforma di RNA isolato non è vantaggioso né facile. Quello che succede è che otteniamo una copia fatta dalla stessa sequenza fatto da cDNA (DNA a doppia elica che è copia dell'RNA). Ottenuto tramite retrotrascrizione.

È un procedimento che trae origine da uno naturale: la trascrittasi inversa (enzima presente nei retrovirus - genoma ad RNA virale, tramite l'enzima producono una copia del loro genoma sotto forma di cDNA poi integrato nel genoma della cellula ospite). Replichiamo in vitro questo processo, a partire dall'RNA messaggero, con due fasi.

1. Sintesi del filamento complementare a quello dell'mRNA

Abbiamo tante molecole diverse ma tutte con coda di PoliA. Uso un primer con una sequenza di T (16-20 nt) e la prima cosa da fare è mischiare l'oligonucleotide con l'mRNA, le T e le A si appiano e otteniamo la regione appaiata. Aggiungiamo oligonucleotidi e trascrittasi inversa (lega il 3' e sintetizza), così da sintetizzare il filamento.

Alla fine ottengo un ibrido - un filamento di DNA appaiato a uno di RNA. Non manipolabile comunque in maniera semplice.

2. Sintesi del secondo filamento per ottenere la doppia elica

Anche in questo caso si sfrutta la coda di PoliA perché ho bisogno di un primer (regione di appiamento tra sequenza da copiare e regione che trascrive)

Ora devo rimuovere l'RNA di partenza e sintetizzare una copia del filamento. Come? La sintesi del secondo filamento si può fare in diversi modi ma ci sono due tecniche principali:

-Tecnica del Self Priming (non usata molto al giorno d'oggi)

Denaturiamo l'ibrido ottenuto, separando i due filamenti e attraverso un idroliso con soluzione alcalina si rimuove l'RNA di partenza. Viene completamente degradato. Il DNA tende a stare sempre in doppia elica, nell'estremità 3' se c'è una regione in cui c'è un po' complementarità con una regione interna, tende a formare delle hairpin loop. Il DNA si ripiega su stesso, uso la struttura di Hairpin utilizzando questa struttura di partenza per cominciare a sintetizzare: aggiungo nucleotidi e DNA polimerasi (spesso di E.Coli)

Otengo una struttura a doppio filamento però unità nella struttura hairpin con parte a singolo filamento. Per rimuovere l'hairpin e mantenere il doppio filamento si utilizza la nucleasi S1, che digerisce la parte a singolo filamento, che viene digerita e rimaniamo con i due filamenti.

-RNA fragment priming

Un sistema che prevede, invece della degradazione completa, tratta l'ibrido con l'enzima RNasi H, un enzima che degrada l'RNA quando è sottoforma di ibrido. La reazione avviene in maniera progressiva, lasciando dei piccoli pezzetti attaccati, così aggiungo la polimerasi che usa i pezzetti di RNA come primer per sintetizzare il filamento complementare.

La DNasi ha attività esonucleasi anche 3'5', quindi quando trova il primer successivo, rimuove i frammenti e inserisce il DNA. Rimuovo così tutto l'RNA. Infine si tratta il risultato con un DNA ligasi, ottenendo due filamenti di DNA.

Una volta isolato il cDNA può essere usato per essere inserito all'interno di un plasmide, copiarlo, ecc.

ELETTROFORESI

L'elettroforesi su gel è costituita da un movimento di cariche in un campo elettrico. E' il metodo più comune per separare molecole di DNA, RNA e proteine sulla base della loro mobilità su un supporto in un campo elettrico e trova numerose applicazioni in biologia molecolare.

Elettroforesi Standard - Elettroforesi Capillare

Il volume vuoto è molto fine, applicando differenza di potenziale tra i due elettrici, si muove da un polo negativo a quello positivo. Tutto il DNA tende a muoversi più o meno nello stesso modo e quindi non ottengo grande separazione.

Elettroforesi su gel

Utilizzando il gel, creo un pozzetto e ho la differenza di potenziale. Ho ovviamente immerso il gel in un tampone (che conduce). Dato che il gel rallenta la corsa, la miscela si separa su gel sulla base delle dimensioni - più i frammenti sono piccoli più si muovono nel gel e vanno verso il polo positivo, più sono grandi più rimangono verso il negativo.

Vengono utilizzati due diversi tipi di gel: di agarosio e di poliacrilammide.

L'agarosio è un polisaccaride che forma un gel con pori variabili tra 100 e 300 nm di diametro a seconda della sua concentrazione. È quindi la percentuale di agarosio che determina la gamma dei frammenti di DNA, RNA o proteine che vengono separati. Tuttavia il gel di agarosio non ha il potere risolutivo per separare molecole di DNA che differiscono soltanto per uno o pochi nucleotidi. Per questo scopo vengono utilizzati i gel di poliacrilammide i quali riescono a separare frammenti diversi anche di un solo nucleotide (range 1-1000 bp) grazie a pori di dimensioni minori rispetto a quelli di agarosio. Il gel è ottenuto per polimerizzazione di acrilammide monofunzionale tramite un cross-legante, l'N, NP-metilenebisacrilammide. A differenza di quelli dell'agarosio, i legami formati nella poliacrilammide sono irreversibili. La matrice è neutra e meccanicamente stabile. Inoltre i gel di poliacrilammide si possono fare a varie concentrazioni (minimo 3%).

Il gel di agarosio che abbiamo in lab è una polvere, il processo di gelificazione avviene semplicemente inserendolo in una soluzione adatta e riscaldandolo, così da farlo diventare solubile e quando si raffredda tende a condensare e formare questo gel.

Più agarosio c'è più il gel è compatto (pori meno densi, piccoli). La quantità di agarosio dipende da quello che devo separare. C'è un limite ovviamente nel range che posso separare con questa tecnica: dal 1,5/2% allo 0,4/0,5%. (rapporto tra quantità in peso e volume di soluzione).

Uso delle vaschette elettroforetiche

Il tampone di corsa è lo stesso che uso per sintetizzare il gel. Tamponi più comuni:

TAE, TBE, TPE, che sono tutti a base di tris e o acetato o borato o fosfato come controione. Noi usiamo TAE. Si prepara uno stock (una madre) di tampone molto concentrato (50X), per comodità così da poter diluire facilmente in momenti successivi.

Abbiamo concentrazione di lavoro 1X, sia per fare il gel sia per il tampone di corsa.

Il pH è compreso tra 7 e 8. Per poter caricare il vampione su gel uso il loading buffer (miscela che contiene sostanze colorate) e una percentuale alta di zucchero (40% - molto densa per tenere il campione sul fondo del pozzetto).

Si usa una differenza di potenziale tra 3 e 5 volt per centimetri. Più aumento la tensione più la corsa elettroforetica è veloce, ma ovviamente aumenta anche la resistenza e si rischia di scaldare troppo la soluzione.

Come faccio a vedere quello che succede?

Inserisco nel gel una molecola (etidio bromuro) che si lega al DNA a doppia elica, che assorbe la luce UV, così da riuscire a vedere dove si lega al DNA. Diventa fluorescente una volta intercalato. Eliminato dai laboratori per la sua tossicità, può causare mutazioni.

Oggi si usano analoghi meno tossici come il SyberSafe - analoghi che fanno la stessa cosa ma si degradano velocemente, che sono molto meno tossici ma lo sono comunque.

Si fa una foto tramite lastra fotografica impressionata e quindi una volta sviluppata ottengo delle bande pari a ciò che ho diviso.

Questi nucleotidi radioattivi si basavano sul fosforo 32, come si ottiene il DNA marcato? tramite nick Translation oppure marcatura end filling, in questo caso la marcatura avviene solo nelle estremità finali.

Più intensa è la banda, più è la quantità del DNA. Prima era molto utilizzato il nucleotide radioattivi, ora si tende ad evitarlo.

Il loading buffer come detto contiene all'interno delle molecole colorate, non hanno a che fare con il DNA ma permettono di seguire la corsa elettroforetica senza la luce UV, così da calcolare cosa sta succedendo al DNA e quando la corsa è completa, dove è arrivato, ecc.

Visto che il DNA si separa sulla base della dimensione. La mobilità elettroforetica dipende dal rapporto tra massa e carica. Se ho due molecole con la stessa massa, quella con più carica tende a muoversi di più. Il rapporto del DNA è tutto uguale, quindi si basa solo sulla dimensione. Utilizzando un marcatore di pesi molecolari posso quindi anche calcolare quanto è grosso il filamento di DNA.

Si caricano nei pozzetti vuoti un marcatore (miscela di frammenti di DNA a dimensioni note) e posso così fare un confronto tra la corsa ottenuta dal campione e quella del marcatore.

Alternativa: poliacrilammide. In questo caso viene usato per gli acidi nucleici, ma soprattutto per le proteine. Il concetto è lo stesso, ciò che cambia è il setup (tipo corre in verticale). Il gel di agarosio non ha il potere risolutivo per separare molecole di DNA che differiscono soltanto per uno o pochi nucleotidi. Per questo scopo vengono invece utilizzati i gel di poliacrilammide i quali riescono a separare frammenti diversi anche di un solo nucleotide (range 1-1000 bp) grazie a pori di dimensioni minori rispetto a quelli di agarosio. A differenza di quelli dell'agarosio, i legami formati nella poliacrilammide sono irreversibili.

LEZIONE 4

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Una delle tecniche più importanti in tutti i laboratori che fanno scienze biologiche. La PCR è la reazione a catena della Polimerasi.

Il nome già implica che c'è bisogno dell'enzima polimerasi, in questo caso specifico è una DNA polimerasi, con caratteristiche ben precise.

Lo scopo della reazione è amplificare un frammento di DNA, partendo da un template con una determinata sequenza, e attraverso questa reazione in vitro, attraverso una serie di cicli, genera una serie di copie della regione di interesse del template. Posso quindi avere un numero esponenziale di copie.

Se anche si parte da una quantità molto piccola di DNA di partenza (anche singole molecole), attraverso questa tecnica posso avere quantità "visibili" (possibile analizzare su gel), clonabili, utilizzabili per studi filogenetici ecc.

La PCR è stata inventata nel 1984, da Kary Mullis, aveva messo appunto una tecnica diversa ovviamente da quella che facciamo oggi (utilizzava una polimerasi normale che doveva quindi essere aggiunta ad ogni ciclo, perché veniva degradata).

Ci si è evoluti con l'introduzione delle polimerasi termostabili e oggi giorno con delle piccole modifiche al protocollo base, la PCR è molto versatile ed usata.

Real Time PCR è una delle variazioni, usata per lo studio funzionale dei geni, quanto dei geni viene espresso in alcune condizioni piuttosto che altre, e in ambito medico (es. studi di malattie ereditarie, test del dna, ecc.)

Viene soprattutto utilizzato per la ricerca e la diagnosi di malattie infettive.

È una tecnica che prevede l'utilizzo di una polimerasi che replica quello che avviene in vivo, in vitro, attraverso la polimerizzazione degli acidi nucleici. La più utilizzata è la Taq (thermus aquaticus) polimerasi. Sono batteri estremofili (in condizioni estreme): questi batteri sono stati isolati nelle pozze di acqua bollente delle zone vulcaniche, con acqua di 80/855 gradi che denaturerebbe le proteine di organismi normali.

Essendo dei batteri che si sono evoluti per vivere in condizioni così estreme, anche il loro bagaglio è evoluto in quel senso: l'attività di polimerizzazione della Taq polimerasi è più alta ad alte temperature.

Perché è essenziale avere una polimerasi termostabile?

La maggior parte dei metodi della PCR si basano su cicli termici, necessari per denaturare il DNA, separando la doppia elica e riappiarle di nuovo.

Abbiamo bisogno ovviamente di un template e di nucleotidi, ma soprattutto c'è bisogno di due oligonucleotidi (primer) la cui funzione è appaiarsi al template e dare alla polimerasi il punto di partenza a cui attaccarsi e iniziare la reazione. Tutte le DNA pol template dipendenti hanno bisogno di un ossidrilico 3' libero, fornito dai primer, per iniziare la polimerizzazione. Inoltre i primer sulla base della loro sequenza, selezionano la regione da cui inizia la polimerasi.

Fasi della PCR:

Prima fase

- La prima fase della reazione consiste nel denaturare il DNA del template - DNA anche

molto grande, quindi la separazione è più difficile. Per avere una separazione completa bisogna raggiungere i 95°.

- si abbassa poi la temperatura (50/60°) e così possono succedere due cose: o il template si riappaia oppure, dato che ci sono i primer, questi si appaiano alle sequenze complementari. Bisogna disegnare primer con sequenze complementari ai due filamenti, così da delimitare le regioni da amplificare.

Seconda fase

- Porto a temperatura di estensione (75°) ovvero quella a cui la Taq polimerasi funziona meglio. Comincia a sintetizzare dei filamenti e va avanti fino alla fine del template

- Ad un certo punto inizia un nuovo ciclo: i filamenti si separano di nuovo. Si appaiano anche i nuovi filamenti, così si generano una serie di frammenti di varie dimensioni, ma quelli che si accumulano in maniera esponenziale sono quelli delimitati dai primer.

-Dopo 35 giri, amplifico circa 200 mln di copie.

Come si fa a decidere il primer?

Devo conoscere almeno una parte della sequenza che voglio amplificare, che la precede e la segue: così scelgo dei primer che siano complementari e delimitino la regione.

Profilo di temperatura:

cicli termici si basano su cambi molto rapidi di temperatura:

-denaturazione a 95°

-Annealing a 55°

-Estensione a 75° il tempo di questo ciclo non è fisso:

la polimerasi ha una certa processività (Taq pol 1000 basi per minuto), se devo amplificare un frammento di 500 basi posso tenerla mezzo minuto in fase di estensione, e così via. (3000 per 3 minuti, ecc)

La dimensione del frammento incide quindi sul tempo di estensione.

La PCR è una serie di cicli che si ripetono. Ciò che tende ad accumularsi è la regione da amplificare (nonostante ne polimerizzino di diverse dimensioni)

Infatti caricando il risultato di una pcr su gel di agarosio, dovremmo vedere un'unica banda netta e definita, della dimensione che corrisponde al frammento amplificato.

Si alternano quindi cambi di temperatura per poter fare la copia del template, ho quindi bisogno di un termociclatore:

Apparecchio che permette di ottenere i cicli di temperatura necessari per la reazione di PCR. È composto da una piastra riscaldante con alloggiamenti per i campioni in grado garantire rapidi cambi di temperatura.

Date le elevate temperature ce si raggiungono durante la fase di denaturazione (95 °C), per evitare l'evaporazione del campione (solitamente 20-50 uL) nei vecchi termociclatori si aggiungeva uno strato di olio minerale nel tubo da pcr. I termociclatori moderni hanno una

coperchio che è possibile scaldare fino ad una temperatura superiore a quella del campione (105 °C) in modo da bloccare l'evaporazione.

TEMPERATURA DI ANNEALING

La scelta della temperatura è importante per la buona riuscita della pcr.

Due primer si devono appaiare ai due filamenti. Se la temperatura è troppo alta i primer non riescono ad appaiarsi, perché l'appaiamento coinvolge solo un paio di legami a idrogeno (30 nt) e la pcr non funziona. Viceversa con temperature troppo basse, i primer si appaiano ma può succedere che alcuni dei primer si appino a regioni simili alla sequenza ma non completamente complementari, ciò può far sì che la polimerasi può iniziare a trascrivere da altre regioni e ci sono degli amplificati sbagliati.

La temperatura viene scelta sulla base dei primer ma solitamente è tra i 50 e i 60°.

ALTRE POLIMERASI TERMOSTABILI

Le tre più usate sono Taq, Pfu e Vent sono sempre recuperate da termofili, la differenza principale è che le altre due rispetto alla taq hanno attività esonucleasica 3'→5' quindi sono in grado di correggere perché fanno proofreading. Abbiamo maggiore affidabilità nell'amplificazione.

La Taq polimerasi commette più errori (mutazioni puntiformi). La scelta è diretta da una questione economica (la taq costa meno). Si sceglie a seconda delle applicazioni.

Per visualizzare la buona riuscita della pcr si caricano su gel e si vede se la banda è quella attesa.

REAL TIME PCR

Una variazione rispetto alla PCR classica è quella che viene chiamata RT PCR. È una modifica della PCR originale, in cui oltre ad amplificare, si quantifica il DNA: lo scopo non è tanto quantificare il prodotto che si amplifica, ma il materiale di partenza. Questa reazione avviene tramite l'uso di un numero assoluto: misuriamo una quantificazione relativa dell'amplificazione rispetto ad uno standard. Importante per studio dell'espressione genica (quanto viene trascritto e espresso) ed è anche la base per i tamponi molecolari. Permette di identificare quanto e se è presente l'RNA virale (prima si retrotrascrivere - non si fa pcr su rna!)

Prima tecnica:

Tecnica è la stessa della pcr ma si usa un termociclatore che misura anche la fluorescenza dei campioni: ha delle fibre ottiche che misurano la fluorescenza - nell'allestimento si inserisce del colorante SYBR green. Non è fluorescente in soluzione, ma intercalato nella doppia elica diventa fluorescente - essendoci sempre più dna durante i cicli, la fluorescenza aumenta man mano. Di fatto abbiamo una curva: all'inizio la fluorescenza è bassa e in seguito aumenta.

Questo colorante costa poco e si lega a prescindere della sequenza, quindi è abbastanza versatile, però non è specifico, quindi se ad esempio si sbaglia e si amplifica una banda addizionale, questo colorante si intercalerà anche lì: non specifico. Non sono in grado di distinguere quindi potrei sovrastimare. Il SYBR Green è una molecola composta da anelli aromatici.

Seconda tecnica:

Fluorescent reporter probe method

Prevede di usare una sonda reporter che è specifica per una sequenza quindi permettono una quantificazione molto più accurata, anche con contaminanti

Nella maggior parte dei casi però è molto più caro e per più sequenze ho bisogno di più sonde. Questa è la tecnica dei tamponi: i reagenti che mancavano erano le sonde fluorescenti.

Come funzionano? Sono polinucleotidi come i primer, alle due estremità ci sono un reporter fluorescente e un quencher di fluorescenza. Se si illumina la soluzione con la luce, il reporter con il quencher blocca la fluorescenza se sono troppo vicini. La sonda è fatta in modo che si leghi all'interno della regione da amplificare, durante l'annealing la sonda si lega come un primer.

La Taq Polimerasi ha un'attività esonucleasica 5'→3', degrada i nucleotidi già appaiati e li sostituisce con i nuovi: degrada quindi la sonda e separa il fluoroforo dal quencher, quindi il fluoroforo è in grado di emettere fluorescenza. Ad ogni ciclo quindi c'è aumento della fluorescenza per l'aumento della regione specifica.

La curva dell'intensità della fluorescenza rispetto al numero di cicli è una sigmoide: Il valore CT in corrispondenza del primo flesso è direttamente proporzionale al numero di copie di template presenti. Ad una minore quantità di template presente corrisponderà una curva spostata verso destra (CT ad un numero di cicli maggiore). Si confrontano dei campioni per avere una quantificazione relativa, si confronta con una standard interno, un gene non influenzato dal trattamento (es. actina, o altro) per normalizzare i risultati ed eliminare errori o differenze dovuti al procedimento di preparazione dei campioni.

La Taq polimerasi ha la caratteristica di lasciare una A sporgente, non ha estremità piatte. Esiste un sistema che permette di sfruttare la A e usare dei vettori che usano delle T, costruire un plasmide con inserto.

LEZIONE 5

Colture Batteriche (E. coli)

Nei laboratori si usano comunemente vari ceppi (strains) selezionati e modificati di Escherichia coli (batterio gram negativo non patogeno) che, a seconda del genotipo (con

mutazioni su particolari geni o introduzione di geni estranei), vengono utilizzati per diversi scopi. In generale si possono dividere in:

- *Ceppi di propagazione* (clonaggio e propagazione di plasmidi)
- *Ceppi di espressione* (espressione di proteine ricombinanti)

I ceppi hanno piccole differenze genotipiche: stessa specie con piccole variazioni.

E. Coli ha un aspetto bastoncellare e si divide per scissione binaria (una sorta di mitosi che da origine a due copie identiche). Ha dei flagelli e il genoma è sottoforma di un unico cromosoma molto grande, ripiegato su se stesso e compattato, occupando una buona parte di citoplasma.

Terreni di coltura:

per crescere e propagare le colonie di batteri - le colonie sono gruppi di batteri che crescono isolate dalle altre, originate tutte da una cellula, tutte poi sono identiche ad essa.

1) *liquidi* (crescita delle cellule, espressione di proteine ricombinanti, ecc.).

2) *solidi* (selezioni di cloni mediate isolamento di singole colonie, propagazione delle colonie o della linea cellulare).

Terreni di colture complessi

(chimicamente non definiti)

I mezzi complessi impiegano estratti grezzi di sostanze come la caseina (proteina del latte), proteine animali, soia, estratti di lieviti, e altre sostanze altamente nutritive: benché chimicamente non definite. Queste sostanze sono commercialmente disponibili in polvere e possono essere pesate e aggiunte al mezzo di coltura, sciolte in acqua ad esempio. Tuttavia uno svantaggio importante dell'uso di mezzi complessi è la perdita del controllo sulla specificità dei nutrienti del mezzo. Il terreno va preparato e poi sterilizzato, perché poi voglio far crescere solo un determinato ceppo batterico.

- LB (Luria Bertani medium): 1% triptone - semidigerito della caseina, 0.5% estratto di lievito, 0.5% NaCl. (se le cellule contengono un plasmide con una resistenza, si aggiunge l'antibiotico opportuno per la selezione). Utilizzati per la crescita di cellule e per l'espressione di proteine ricombinanti non modificate. Vantaggio di essere molto nutrienti, contengono tutto ciò che serve per crescere e in maniera abbastanza veloce, usati quindi per crescere le cellule e far esprimere una determinata proteina.

Terreni di colture minimi (chimicamente definiti)

I mezzi chimicamente definiti sono preparati aggiungendo all'acqua distillata quantità precise di sostanze chimiche organiche o inorganiche. Perciò, è nota la composizione chimica esatta di un mezzo definito. In molti casi, comunque, la conoscenza della composizione chimica esatta non è critica. In questi casi i mezzi non definiti possono

essere sufficienti, o persino vantaggiosi.

Terreno comune: M9, c'è dentro il sodio di idrogeno fosfato, il sodio cloruro, l'ammonio cloruro. Ammina e glucosio, so esattamente cosa c'è e quanto ce n'è - i batteri crescono anche con pochissimi elementi perché sono in grado di sintetizzare tutti i componenti cellulari di cui hanno bisogno. La crescita è quindi molto più lenta.

Opportunamente addizionati di particolari elementi, vengono utilizzati per la selezione di ceppi auxotrofi (incapaci di sintetizzare un particolare composto organico necessario per la propria crescita) o l'espressione di proteine ricombinanti modificate (arricchite in un particolare aminoacido modificato (es Seleniometionina) o con varianti isotopiche (^{13}C o ^{15}N) esistono terreni che permettono di fare delle cose particolari).

I terreni solidi differiscono dai terreni liquidi per l'aggiunta di Agar: l'agar se riscaldato e poi raffreddato diventa un gel, di fatto è la versione meno pura dell'agarosio che viene aggiunta per ottenere la consistenza voluta. Viene colato in piastre petri (piastre di plastica sterili). L'agar può essere aggiunto sia a terreno solido che terreno complesso. Dato che nella maggior parte di casi voglio fare una selezione di batteri con resistenza, si ha un terreno selettivo con antibiotico.

CLONAGGIO DI GENI

Dal punto di vista generale, quando si parla di clonaggio di geni: ho un vettore che solitamente deriva da un plasmide batterico (isolato e modificato con le caratteristiche volute che abbiamo visto in precedenza). Dopo di che viene recuperato il gene di interesse dal genoma della cellula - si preferisce usare il cDNA. Si introduce il frammento di DNA esogeno all'interno del plasmide che si inserisce in un'altra cellula batterica, si sceglie una colonia e si fa riprodurre, per amplificarla.

Strategia per il clonaggio di frammenti di DNA

- 1) Digestione del frammento con endonucleasi di restrizione.
- 2) Digestione del vettore e defosforilazione.
- 3) Ligazione.
- 4) Introduzione ed amplificazione del DNA ricombinante in una cellula ospite. - Trasformazione
- 5) Analisi delle colonie.

Devo far digerire il frammento e il vettore (anche defosforilato) a questo punto vengono messi insieme e si genera la molecola ricombinante attraverso la combinante. Successivamente si analizzano le colonie e si sceglie quella da amplificare.

Uso un vettore con code di T, per appaiare le estremità sporgenti A dei prodotti della PCR: ottengo una struttura in cui ho inserito il vettore nel plasmide. Questo sistema CLONAGGIO TA

nonostante sia molto veloce da fare, è poco usato perché ha lo svantaggio che pochi plasmidi hanno le A libere. Nella maggior parte dei casi devo usare gli enzimi di restrizione

Come si inseriscono i siti di restrizione alle estremità dell'inserto da clonare?

Genero delle estremità coesive compatibili, se si mischiano i vettori con estremità coesive si appaiano e la ligasi genererà la molecola di DNA circolare alla fine.

Come si generano le estremità coesive?

Nel caso dei vettori il problema non sussiste, perché c'è il polilynker aggiunto, in cui sono presenti una serie di sequenze che sono riconosciuti da un enzima di restrizione.

C'è un sito BamH 1 in un polylinker, come faccio ad averlo nel frammento? Lo devo aggiungere:

1) tramite linker - piccoli filamenti di DNA a doppia elica che contengono la sequenza di interesse. Il gene viene mischiato con i linker di interesse (entrambi con estremità piatte), dopodiché si inserisce la ligasi che attacca uno dopo l'altro i linker, non posso controllare però quanti. Alla fine il frammento ottiene copie di linker attaccati. Viene quindi digerito dall'enzima BamHI che trova le sequenze da tagliare dei linker e lascia il filamento originale con all'estremità un unico linker. Svantaggio: posso così inserire un unico sito di restrizione ad entrambe le estremità.

Oggigiorno non si usa più

2) Attraverso PCR:

Quando si pianifica un clonaggio si decidono gli enzimi con criterio, bisogna stare attenti che non esista all'interno del frammento un sito riconosciuto dagli enzimi di restrizione.

Esistono una serie di server, in cui se inserisco una determinata sequenza mi dice quali sono i siti di ristretizione.

Se oltre al primer inserisco nella regione 5' una sequenza che non si appaia ma contiene un sito di restrizione e faccio la PCR, quello che ottengo sequenze amplificate della sequenza amplificata con aggiunti i primer e i siti di restrizione.

Meno lungo e più semplice - posso utilizzare primer che mi permettono di inserire siti di restrizione diversi alle due estremità.

Digestione con enzimi di restrizione

- Scegliere enzimi di restrizione presenti come siti unici nel polylinker del vettore di destinazione e che non digeriscano anche il frammento di interesse.
- Utilizzando un singolo enzima per entrambe le estremità si otterranno costrutti in cui l'inserto sarà presente statisticamente nelle due orientazioni.

- Utilizzando due enzimi diversi l'inserto avrà una direzione obbligata > clonaggio direzionale. Per alcune applicazioni ciò è importante perché potrei ad esempio non riuscire ad esprimere una proteina se è posta al contrario.

Defosforilazione del plasmide digerito

Trattando il plasmide digerito con una fosfatasi (es. CIP Calf Intestine Phosphatase) si rimuove il gruppo fosfato all'estremità 5' che rimane attaccato dopo la digestione, evitando che il plasmide possa richiudersi senza l'inserto dando origine a falsi positivi. Il fosfato sarà solo alla fine dell'inserto, così che sia obbligato a essere inserito per la corretta chiusura del plasmide, trattato ovviamente con ligasi.

Ligazione

Reazione più o meno semplice perché tratto la miscela (vettore e inserto) con la ligasi, il vettore e l'inserto si appaiano e la ligasi genera il legame.

Trasformazione : introduzione di DNA plasmidico in cellule batteriche

Quando si introduce un plasmide all'interno della cellula, questo viene replicato molte volte e questo fornisce ai batteri le qualità desiderate. Se il batterio contiene ciò che serve, sopravviverà sul terreno selettivo e comincerà a creare una colonia e si può prendere una colonia, inocularla in un terreno di coltura liquido e generare molte più cellule: posso ottenere una grande quantità di DNA ricombinante.

Nella maggior parte dei casi ho presente anche altri frammenti dopo la PCR (contaminanti). Quando faccio la ligazione posso avere degli inserti non di mio interesse, o un vettore legato su se stesso senza inserto (non dovrebbe succedere, ma tutte le reazioni chimiche non sono mai tutte complete al 100%). Ogni cellula incorpora un tipo di plasmide vuoto quindi non tutte avranno il plasmide di interesse ma potrebbero averlo vuoto ecc., dato che tutte hanno il plasmide comunque, sopravvivranno, come faccio a sapere quale ha il frammento di mio interesse? (dopo)

- Non tutte le specie batteriche assumono DNA esogeno con la stessa efficienza.
- In laboratorio solo poche specie (soprattutto dei generi *Bacillus* e *Streptococcus*) possono assumere DNA estraneo con facilità.
- In condizioni normali i batteri, tra cui anche *E. coli*, incorporano DNA solo in quantità limitate. Per migliorare l'efficienza della trasformazione, le cellule devono subire un trattamento chimico e/o fisico. Queste cellule vengono dette competenti.

Preparazione di cellule competenti con CaCl_2

Cellule di *E. coli* immerse in una soluzione ghiacciata di CaCl_2 (ma funzionano anche altri sali di cationi bivalenti come RbCl_2) assumono la capacità di legare le molecole di plasmide sull'esterno della cellula, questo poi viene internalizzato mediante un shock termico (dal ghiaccio a 42 gradi al ghiaccio nuovamente). Si modifica quindi la parete delle cellule con i sali così che sia in grado di legare all'esterno il DNA, e con lo shock termico

che crea dei pori così che il DNA possa essere trasportata all'interno, ovviamente senza essere stati resi competenti, non ha senso.

Metodo alternativo per la trasformazione: elettroporazione

Le cellule vengono mescolate con la soluzione contenente il plasmide e sottoposte ad una repentina scarica elettrica ad alto voltaggio che apre pori nella membrana e permette l'ingresso del DNA. Questo metodo può essere applicato anche a cellule eucariotiche.

Si prende la sospensione di cellule e si mettono in delle cuvette con lati di metallo poste in un elettroporatore (tensione molto alta per un tempo molto limitato) così da alterare la permeabilità della membrana.

Selezione delle cellule trasformate

La stragrande maggioranza delle cellule comunque non ingloba il plasmide quindi: Prima di piastrare su terreno selettivo, si incubano le cellule in terreno non selettivo per permettere l'espressione degli enzimi che conferiscono la resistenza. Tutte le cellule che contengono un vettore, sia ricombinante (con l'inserito) che non, danno origine a colonie resistenti. Ogni singola colonia contiene dei cloni della cellula generata e se è sopravvissuta al terreno con antibiotico ha il plasmide anche se non hanno l'inserito.

Il passaggio con terreno liquido serve solo a dare il tempo alle cellule di esprimere il gene della resistenza all'antibiotico.

Identificazione delle colonie ricombinanti (che contengono il gene o l'inserito di interesse) tramite inattivazione inserzionale.

Il passaggio successivo è capire quali colonie hanno l'inserito. Questo metodo (inattivazione inserzionale) viene usato solo con un determinato tipo di vettori: in questi vettori il polylinker, si trova in una regione del plasmide che a sua volta contiene un gene che da un certo prodotto genico, se però ho l'inserito il gene in questione viene distrutto, quindi non ho alcun prodotto genico (ad esempio con la b-galattosidasi), solitamente il gene codifica per lac-Z' che codifica per la b-galattosidasi (pUC8). Normalmente si usa questo plasmide in accoppiata con E.Coli che produce b-galattosidasi incompleta, ma se si introduce il pUC8, il genoma riproduce la parte incompleta e il plasmide la parte che manca e ho l'enzima completa. La b-galattosidasi digerisce il lattosio, ma anche dei suoi analoghi (x-gal) che quando viene digerito da origine ad un composto colorato, quindi quando ho questo enzima attivo ho delle colonie azzurre, se invece le colonie non hanno il lac-z' completo le colonie non sono in grado di metabolizzare x-gal e quindi non sono azzurre e non hanno quindi l'inserito. Può essere usato solo un determinato tipo di vettori.

La maggior parte dei vettori non è applicabile questo metodo, quindi uso il **Colony-PCR**:

Il metodo è semplice, le colonie vengono numerate sulla piastra e poi sciolte all'interno di una provetta da PCR. A questo punto aggiungo tutti i componenti della PCR e effettuo la PCR: durante la prima fase di lisi, le cellule rilasciano anche il plasmide, se nel plasmide è presente l'inserito e uso dei primer che si appaiano con esso avrò l'amplificazione, altrimenti se l'inserito non è presente non avrò alcuna amplificazione.

Nel caso si utilizzino **vettori derivati da DNA virale**, si parla di:

Trasfezione : introduzione diretta di DNA virale nelle cellule.

Infezione : introduzione del DNA nelle cellule da particelle virali già formate.

Se l'inserito è contenuto in un **vettore di origine fagica**, non avremo colonie di batteri che sopravvivono ma, al contrario, placche di lisi (costituite da cellule batteriche morte) corrispondenti alle zone di infezione di ciascuna particella fagica e quindi di ogni singola molecola di DNA ricombinante. Questi tipi di vettori sono molto usati per la creazione di librerie.

L'infezione fagica si realizza utilizzando fagi preformati in vitro si visualizza sotto forma di placche su piastre di agar coperte di batteri.

LEZIONE 6

BLOT

Un insieme di tecniche (di blotting) che servono per trasferire su un supporto (membrana, nitrocellulosa, PVDF, ecc) i componenti di miscela separati tramite elettroforesi su gel (di agarosio o poliacrilammide) e visualizzare le molecole con una serie di metodi diversi. Quando si fa correre un gel se si guardano i vari componenti, si vede un po' la situazione generale; con i blot vado a cercare, in una miscela complessa, una specifica componente.

I metodi più comuni sono Southern (DNA), Northern(RNA) e Western (proteine) blot. Ne esistono poi tecniche intermedie che permettono di ottenere diverse informazioni.

Ovviamente le tecniche differiscono abbastanza tra quelle specifiche per gli acidi nucleici e quelle per proteine.

Southern Blot

Il Southern Blot è una tecnica usata in biologia molecolare per rivelare la presenza di specifiche sequenze di DNA in una miscela complessa. Prende il nome dal suo inventore, Edwin Mellor Southern, le altre sono state poi nominate Northern e Western, a partire da questa.

L'idea è: prendo una miscela di frammenti di DNA, ognuno di essi ha dimensioni e sequenze diverse. Voglio trovare una specifica sequenza (sapere se è presente).

La prima cosa da fare è fare il gel e separare il DNA su di esso.

Solitamente si arriva ad avere dei frammenti molto lunghi, che però caricati sul gel sono talmente grandi che rimarrebbero attaccati al pozzetto.

Preparazione del campione per il SB

Un campione eterogeneo di dna genomico viene trattato con enzimi di restrizione e successivamente sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio o di poliacrilammide.

Nel gel sarà possibile osservare uno *smear*, ossia una striscia continua; non si vedranno bande nette perché il DNA genomico digerito con l'enzima di restrizione ha tantissimi punti di taglio, quindi sul gel si troveranno tantissimi frammenti che migreranno con velocità

diverse in base al diverso peso molecolare.

La prima cosa da fare è quindi far digerire il DNA a degli enzimi di restrizione.

- Il gel viene quindi immerso in una soluzione fortemente alcalina (NaOH) per circa 15 minuti che permette la denaturazione del DNA. Cioè separo la doppia elica, così da poter identificare le sequenza tramite appaiamento.

- Il gel viene quindi coperto da una membrana di nitrocellulosa e sopra di questa viene posta una pila di fogli assorbenti.

- Per capillarità la soluzione tenderà ad attraversare il gel, il foglio di nitrocellulosa e

risalirà nei fogli assorbenti. I sali trascinano i segmenti di DNA perfettamente in verticale,

depositandoli sullo strato di nitrocellulosa con il quale i segmenti instaurano legami elettrostatici. Da notare che in questo passaggio il DNA non sale grazie a una forza elettrica come nella prima elettroforesi ma solo per capillarità.

Le vaschette per il blot ad oggi permettono di fare corse elettroforetiche e blot sulla stessa vaschetta direttamente.

Identificazione della sequenza di interesse

La cosa più semplice è usare una sonda (oligonucleotidi complementari alla sequenza che cerchiamo) e la sonda ibriderà e si legherà alla sequenza di interesse. Ovviamente la sonda deve essere marcata (nucleotidi radioattivi oppure con fluorofori)

- Il foglio di nitrocellulosa viene separato dal gel e immerso in una soluzione contenente una sonda marcata in vario modo (fluorescenza, radioattività, ecc..) che ibridizza con sequenze di DNA complementari presenti sul foglio, identificandole. L'ibridizzazione della sonda con il DNA può avvenire con diversi gradi di "stringenza" a seconda delle finalità

dell'esperimento, consentendo una ibridizzazione con specificità anche inferiore al 100%, ossia la sonda si lega solo se è complementare al 100% o ad una data specificità. Posso così cercare anche sequenze simili e non solo determinate seq.

- A seguito di lavaggio della nitrocellulosa per eliminare le sonde non ibridate, si fa una lastra fotografica che metta in evidenza dove la sonda ha legato il dna genomico.

Northern Blot

Il Northern Blot è una tecnica che permette di visualizzare ed identificare l' RNA purificato da un campione, in particolare per studiare l'espressione genica. Il nome è derivato per assonanza dalla tecnica analoga per il DNA (Southern blot) ed è molto simile ad essa.

Dal punto di vista operativo la tecnica è simile al southern blot usato per il DNA, con alcune differenze:

- L'RNA è molto più sensibile alle nucleasi quindi bisogna usare tamponi preparati con acqua DEPC e materiale autoclavato ed indossare sempre i guanti.

- L'RNA tende a formare strutture secondarie stabili in soluzione; per fare in modo che la mobilità elettroforetica sia solo dipendente dalla lunghezza del frammento, l'RNA deve

essere preventivamente denaturato (solitamente esponendolo ad alte temperature oppure facendo la corsa del gel con agenti denaturanti).<- Inoltre, la corsa elettroforetica deve essere eseguita in presenza di agenti denaturanti, solitamente formaldeide e formammide

- il legame del RNA con la membrana è debole, viene quindi stabilizzato mediante irradiazione con raggi UV che creano legami covalenti (crosslinking).

Per il resto si prosegue come in Southern, si può usare il northern anche per comparare diverse espressioni dello stesso gene (anche qui si può usare l'actina per normalizzare)

Si studia anche qui per valutare il modo in cui geni vengono espressi, però ad oggi si tende ad eseguire tecniche più semplici e accurate (come la pcr rt)

Western Blot

Il western blot o immunofissazione è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela complessa mediante il riconoscimento da parte di

anticorpi specifici; in generale, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di

poliacrilammide. Successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa o PVDF, e quindi si procede al

riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico (prerequisito).

È una tecnica molto usata anche oggi ed è sempre molto simile a quella già vista.

Sodium DodecylSulphate PoliAcrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE

L' SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, ossia elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) è una

tecnica analitica che permette l'analisi di estratti proteici. Il principio su cui si basa questa tecnica è l'attività denaturante dell'SDS e la separazione su gel.

L'SDS è un detergente composto da una testa idrofilica ed una coda idrofobica ed è in grado di interagire con le proteine in un rapporto costante 1.4g SDS ogni g di proteina.

L'SDS è in grado prima di denaturare le proteine, rimuove tutte le strutture secondarie e la riduce ad una catena di amminoacidi a cui si lega, caricandola negativamente. Tutte le proteine si muoveranno quindi verso il polo positivo,

La separazione avviene quindi per differenza fra pesi molecolari visto che il rapporto massa/carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante e tutte le proteine sono caricate allo stesso modo.

Polyacrylamide Gel

È un gel costituito dalla polimerizzazione di un monomero di acrilammide e uno di bisacrilammide, sono in soluzione e una volta mischiate e aggiunte loro due catalizzatori

(TEMED e ammonio) che sono in grado di generare radicali, che danno il via alla polimerizzazione che produce delle maglie di questi monomeri, generando un gel con pori.

- Può essere continuo o discontinuo (stacking gel + running gel) - si usa spesso il discontinuo.

Il gel discontinuo è fatto da stacking gel in cui ci sono pozzetti, e stacking gel in cui le proteine fanno la loro corsa. Qui la corsa avviene in verticale. Applicando una differenza di potenziale (con il positivo, verso cui le proteine vanno, sotto) e abbiamo una separazione a seconda del peso molecolare.

Le proteine (in SDS e b-mercaptoetanol) vengono caricate in un pozzetto. La maggior densità fa sì che non si mescoli con il tampone della corsa. Le proteine vengono quindi concentrate nello stacking gel e separate nel running gel. In genere, nella soluzione di proteine si inserisce un colorante "tracciante" per poter fermare la elettroforesi al massimo della sua risoluzione.

- Può contenere SDS (gel denaturante) oppure no (gel nativo, non usato molto spesso).

Esso può essere utilizzato anche per gli acidi nucleici.

Anche qui uso dei marcatori di pesi molecolari, ovvero proteine a peso noto, così da potersi orientare. Otteniamo delle serie di bande.

Una volta corso il gel, le proteine possono essere visualizzate mediante colorazione con blu di Comassie oppure trasferite sulla membrana per il Western Blot, per identificare una proteina poco abbondante nella miscela.

Western Blot

A differenza del Southern Blot, dove il trasferimento avviene per capillarità, in questo caso avviene mediante l'applicazione di un campo elettrico. Avviene sempre il trasferimento da gel di poliacrilammide su una membrana.

Si crea una specie di sandwich tra due spugnette e due filtri, in cui in mezzo si ha il gel e una membrana. Le proteine, cariche negativamente per la presenza dell' SDS, migrano dal gel verso la membrana, rimangono lì attaccate.

La proteina di interesse viene rivelata sulla membrana mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico e di un sistema di rivelazione. I sistemi più comuni utilizzano un anticorpo primario ed uno secondario (che a sua volta riconosce il primario), quest'ultimo coniugato ad un enzima (perossidasi o fosfatasi alcalina) che, in presenza di un opportuno substrato, dà origine ad un prodotto colorato e quindi visibile, oppure ad una reazione che emette chemiluminescenza rilevabile per mezzo di una lastra fotografica.

Nella regione variabile, l'anticorpo ha una forma ad Y e ogni anticorpo ha due regioni che legano l'antigene, sono identiche. Il legame tra l'anticorpo e l'antigene avviene verso l'epitopo. Noi abbiamo bisogno di un anticorpo che riconosca almeno una regione della proteina di interesse (la proteina può legare più proteine).

Normalmente si usano due anticorpi:

Anticorpo primario: riconosce la proteina di interesse.

Anticorpo secondario: riconosce la regione costante dell'anticorpo primario. È coniugato ad un enzima per la rivelazione.

Questo sistema è usato così da poter usare sia diversi anticorpi primari, ma lo stesso anticorpo secondario: la prima cosa da fare dopo aver trasferito sulla membrana bisogna bloccare la proteina per non far sì che l'anticorpo interagisca con la membrana e non con la proteina. La membrana viene quindi saturata con delle proteine (usando il latte - blocking solution). Viene poi immersa nella soluzione con anticorpo primario che si lega alla proteina che riconosce la sua regione variabile, il suo antigene specifico, si fanno poi dei lavaggi (che tolgono l'anticorpo non legato). Si inserisce poi l'anticorpo secondario, legato ad un enzima (es. fosfatasi), si fanno altri lavaggi e l'anticorpo secondario si lega all'epitopo dell'anticorpo primario - si utilizza quindi un substrato dell'enzima che dà origine ad una molecola colorata, DDAO fosfato.

Diversi sistemi di rivelazione:

-HRP, perossidasi che sfrutta l'acqua ossigenata per ossidare il substrato: sfrutta un reattivo -ECL, miscela di un composto (luminol) con acqua ossigenata - quando il luminol viene ossidato si origina una molecola chemoluminescente con cui si può quindi impressionare una lastra fotografica.

-DAB(Cloronaftolo) è una molecola che in presenza di acqua ossigenata e anticorpo dà origine a un composto blu che colora la membrana.

LEZIONE 7

Vettori non plasmidici e vettori per organismi eucarioti

Esistono una serie di altre tecniche e vettori che non si sono visti finora.

I plasmidi come molecole naturali non sono presenti solo nei batteri, ma anche in altri organismi (anche eucarioti, anche se meno presenti) - la maggior parte di questi sono per lieviti inferiori (lieviti, funghi, ecc.) ma anche superiori (piante e mammiferi).

- Molecole di DNA plasmidico si possono ritrovare anche in organismi eucarioti (es. lieviti).
- Hanno una diversa organizzazione dei geni e una diversa origine di replicazione .
- Possono essere usati per costruire vettori per introdurre geni esterni in cellule eucariotiche (lieviti, cellule di mammifero in culture ecc.)

Ciò è molto utile per lo studio dell'attività dei geni, per quanto riguarda le applicazioni biomediche ecc. Es. vengono prodotte in cellule umane con plasmidi per lo studio di infezioni virali.

Per poterlo fare devono avere determinate caratteristiche, poiché il processo di replicazione sono molto diverse tra procarioti ed eucarioti.

Vettori per lieviti

Sono organismi semplici e monocellulari, è quindi più semplice operare con essi.

I mitocondri sono gli organelli più presenti e possono avere la parete cellulare.

Non sono sensibili agli antibiotici che usiamo per la selezione dei batteri, quindi sia che abbiano il plasmide oppure no, non avremo alcuna differenza e non sono selezionabili.

La selezione di solito si fa con un marcatore di selezione, che si basa su dei ceppi auxotrofi (si utilizzano lieviti modificati per avere un gene difettivo es Leu2-), di conseguenza in un terreno a cui manca l'amminoacido che è codificato dal gene difettivo. Il plasmide quindi conterrà il gene Leu2, completo e funzionante, quindi sopravvivono solo le cellule di lievito che hanno integrato il plasmide, perché è in grado di sintetizzare la leucina.

Tutta la parte di manipolazione del DNA conviene farla con i batteri che con i lieviti. I plasmidi per lieviti contengono anche un marcatore di selezione per lieviti. Contiene un'origine di replicazione batterica e una per lievito: ha le caratteristiche per essere selezionato sia nei batteri che nei lieviti - posso quindi fare tutta la parte di clonaggio dei geni nei batteri (inserimento del DNA esogeno, selezione delle colonie, ecc.) e poi lo trasferisco all'interno del lievito e faccio la selezione nel mezzo con leucina.

Plasmidi episomici di lievito (YE_p) -> possono esistere isolati o integrarsi in uno dei cromosomi per ricombinazione omologa (tramite un processo di ricombinazione, il plasmide diventa parte del cromosoma del lievito).

Vettori derivati da Batteriofagi

I batteriofagi sono virus che infettano i batteri, il vantaggio è che i batteriofagi non sono infettivi per l'uomo, quindi sono più sicuri. Ci sono due classi:

-Batteriofagi testa e coda

la testa contiene il DNA e la coda è usata per infettare il batterio

-Batteriofagi filamentosi

Virus che hanno un capsido formato a tante subunità della stessa proteina, che circondano una molecola circolare del DNA.

Anche il loro ciclo vitale è molto diverso:

-I fagi testa e coda (prototipo è il fago lambda che infetta E. coli) si lega a qualche proteina di membrana, introduce il suo genoma all'interno del citoplasma della cellula batterica (quando è contenuto nel capsido è lineare, quando è nel batterio circularizza) e può fare due cose: via lisogena (si integra nel cromosoma batterico e si replica assieme ad esso) e via litica (il genoma del fago viene escisso da quello batterico e replicato per generare un gran numero di proteine virali e tradotto, quindi si generano i virus che lisano la cellula e vengono rilasciati all'esterno e mandare avanti l'infezione)

-Nel caso dei fagi filamentosi, l'introduzione avviene attraverso il pilo, questo tipo di fago non ha un esito litico. I virus vengono prodotti e rilasciati gradualmente, senza distruggere la cellula.

Utilizzo dei genomi: generare vettori per la manipolazione di DNA.

Il genoma del fago lambda può essere lineare o circolare (nella cellula batterica). Quando è lineare il fago termina con due regioni a singolo filamento (estremità coesive), così si ottiene la

molecola circolare (le due estremità si appaiano). La circolarizzazione permette che il fago replichi la forma del DNA, attraverso il meccanismo cerchio rotante, in cui la polimerasi continua a produrre una copia dopo l'altra.

Tra tutte le proteine codificate dal fago esiste un endonucleasi, in grado di riconoscere le sequenze **cos**, taglia in quel punto e genera le estremità coesive, liberando le singole copie del DNA (lineari). Ciascuna copia viene poi introdotta in un capsido neosintetizzato, che potrà infettare altri batteri.

Il genoma del batteriofago è relativamente piccolo (50 mila paia di basi), contiene una serie di geni utili al suo ciclo vitale (geni per il capsido, la replicazione, ecc.). C'è però una regione che non contiene geni essenziali (regione b2):

- La regione non essenziale del genoma può essere sostituita con un polylinker (MCS) per l'introduzione di un gene esogeno.
 - Con il vettore così ottenuto si infettano cellule batteriche che produrranno forme mature del fago contenute il gene di interesse.
 - Utilizzati spesso per creare librerie (collezioni di cloni di geni) -> Popolazioni di fagi ciascuno con una copia di un gene specifico.
- I **VETTORI DI SOSTITUZIONE**, in cui il DNA facoltativo è contenuto in un frammento di riempimento (stuffer region), fiancheggiato da una coppia di siti di restrizione, che viene rimpiazzato quando il DNA da clonare è legato al vettore. All'interno della testa dei fagi λ non possono essere impaccate molecole con dimensioni minori del 78 % o maggiori del 105% della lunghezza del DNA del fago wild-type. Solitamente la lunghezza media della sequenza è di 48 kb ed è quindi possibile inserire frammenti di DNA fino a raggiungere una dimensione finale compresa fra 36-51 Kb . Sono impiegati per la preparazione di librerie genomiche (DNA).
 - I **VETTORI DI INSERZIONE** , in cui una porzione del DNA facoltativo è stata rimossa ed è stato introdotto un sito di restrizione unico per l'inserimento di massimo 9-10 Kb (non esiste limite minimo). Sono impiegati per la preparazione di librerie di cDNA.

YAC

La dimensione degli inserti genomici che sono portati in vettori tradizionali è limitata a 20-25 Kb per il fago λ e 40-45 Kb per i cosmidi. Questi vettori sono quindi di scarsa utilità per la preparazione di librerie genomiche. Il cromosoma artificiale di lievito, yeast artificial chromosome (YAC), è portato come cromosoma sovrannumerario in *Saccharomyces cerevisiae*, può contenere fino a 2 megabasi.

I primi YAC sono stati costruiti dopo che lo studio dei cromosomi naturali aveva mostrato che, oltre a contenere geni, ognuno di essi presenta tre componenti importanti:

- centromero**: consente una corretta distribuzione dei cromosomi tra le cellule figlie durante la divisione cellulare
- telomeri**: strutture alla fine del cromosoma necessarie per una corretta replicazione e per impedire la perdita di basi alle estremità.

-ARS (sequenze replicantesi autonomamente): origini di replicazione da dove inizia la sintesi di nuovo DNA quando il cromosoma si divide.

Quindi anche YAC doveva averle, per essere trattato come un cromosoma "extra"

In uno YAC, le sequenze di DNA che rappresentano queste componenti del cromosoma sono associate ad uno o più marcatori di selezione ed almeno un sito di restrizione nel quale è inserito il nuovo DNA.

BAC e PAC

I sistemi BAC (cromosomi batterici artificiali) e PAC (cromosomi batterici derivati da P1) sono basati su *Escherichia coli* e sul fattore F plasmidico che mantiene pari a 1 il numero di copie del BAC nella cellula, in modo da massimizzare la stabilità della molecola (no ricombinazioni che sarebbero possibili se ci fossero più copie dello stesso BAC). Questi

vettori sono capaci di mantenere frammenti di DNA maggiori di 300 kb con un elevato grado di stabilità anche dopo cento generazioni di crescita. Grazie all'efficienza di clonaggio, alla facilità di manipolazione e al mantenimento stabile del DNA clonato, il sistema BAC rappresenta oggi il sistema più utilizzato per la costruzione di librerie di genomi complessi.

PBACe3,6 e i vettori PAC (cromosomi artificiali derivati dal fago P1) possiedono un altro sistema di selezione. Essi portano il replicone del fattore F, il gene per la resistenza ad antibiotici (cloramfenicolo per PBACe3,6, kanamicina per PAC) e un pUC link, fiancheggiato da siti di clonaggio, all'interno del gene *sacB*. Il pUC link, rimosso da enzimi di restrizione per inserire il DNA esogeno, è utilizzato per selezionare le cellule trasformate. Il prodotto genico di *sacB*, una levansaccarasi, produce metaboliti tossici da saccarosio. I cloni ricombinanti, in cui il DNA inserito sostituisce le sequenze pUC link, possono crescere in piastre di agar con antibiotico e saccarosio perché il gene *sacB* non può essere espresso. I BAC vengono trasferiti a *E. coli* mediante elettroporazione.

Anche qui lo scopo è introdurre frammenti molto grandi.

LIBRERIE DI DNA GENOMICO E DI DNA

Il primo passo per clonare un gene da un organismo di solito implica la costruzione di una genoteca di DNA, **un gruppo di cloni di DNA contenente, nell'insieme, l'intero genoma**. Talvolta, singoli cromosomi di un organismo sono isolati con una procedura che li seleziona in base alla dimensione ed al contenuto di DNA. Il DNA dei cromosomi isolati è poi usato per costruire genoteche di DNA di un cromosoma specifico. La diponibilità di tali genoteche rende molto più facile la ricerca di un gene che è noto trovarsi su un particolare cromosoma, in special modo per organismi con genomi grandi, come quello dell'uomo.

Oltre al genoma, è possibile rappresentare in librerie il trascrittoma di un organismo, ossia l'insieme delle sequenze di DNA che vengono trascritte in mRNA. Mediante una trascrittasi inversa (enzima codificato da retrovirus a RNA), si sintetizzano molecole di cDNA, cioè di DNA complementare all'RNA. I cDNA possono essere inseriti in vettori plasmidici o del fago 2. Partendo dall'RNA messaggero, i genetisti sono capaci di costruire una libreria di cDNA che contiene solo le regioni codificanti dei geni espressi in un organismo. La disponibilità della sequenza genica priva di introni costituisce un

codice di lettura universale, indipendente dai meccanismi specie-specifici di splicing e cioè di maturazione dell'RNA.

Fagi di inserzione come EMBL 3A che permettono l'introduzione di frammenti di DNA anche di 10-15 Kb possono essere impiegati nella costruzione di librerie genomiche. Nei vettori di inserzione la dimensione massima della sequenza che è possibile introdurre è circa 7 Kb, ciò rende ancora oggi fagi di inserzione (tipo ngf 10) i sistemi ideali per la costruzione di librerie di cDNA che rappresentano il trascrittoma di un organismo, dato che l'mRNA maturo non supera mediamente le 5-6 Kb.

Vettori fagici -> possono contenere frammenti di DNA molto più lunghi (fino a diverse Kb) rispetto ai vettori basati sui plasmidi batterici.

Libreria Genomica

- contiene frammenti di DNA genomico di una cellula qualsiasi di un organismo, di grandi dimensioni (30-100Kb) in modo che è probabile che in ognuno sia contenuto un gene per intero.
- Costruita di solito in vettori fagici, cosmidi (permettono di accogliere frammenti di DNA grandi) o cromosomi artificiali (es Yeast artificial chromosome YAC).

Libreria di cDNA

- contiene solo le regioni codificanti dei geni retrotrascritte a cDNA -> inserti di dimensioni molto minori.
- Ovviamente avremo solo le espressioni di geni espressi in quel periodo preciso della vita dell'organismo.
- Costruita di solito in vettori batterici o fagici di inserzione.
 - Per un singolo organismo ci possono essere più librerie di cDNA ricavate da diversi tessuti con caratteristiche di espressione diverse.

I vettori devono essere opportunamente scelti per il tipo di libreria che si vuole costruire (vettori batterici o fagici di inserzione per il cDNA)

Cosmide -> particolare vettore che contiene le sequenze COS del fago lambda. Si può propagare come un plasmide batterico e può dare origine ad una serie di fagi ciascuno con un inserto (libreria) attraverso il processo di "packaging in vitro" - permette di creare dei fagi in vitro, si spezzetta il DNA in frammenti e attraverso un processo di livazione si lega una concatenazione di frammenti e cosmidi. Attraverso l'utilizzo di questa tecnica posso generare frammenti di interesse con le due estremità con sequenze cos. Attraverso l'inserzione di questi frammenti nelle cellule batteriche, un trattamento con endonucleasi e l'impacchettamento con proteine virali, ottengo dei virus artificiali, ciascuno con una copia delle molecole (non esattamente uguali ai virus originali, non infettano ma possono trasferire il genoma sulla cellula batterica)

Identificazione di un Clone in una Libreria

Libreria -> collezione di frammenti di DNA (cloni)

- Libreria genomica
- Libreria di cDNA

Nella libreria voglio isolare un clone particolare. Vi sono due metodi:

1. *Selezione diretta*

Si basa sul fatto che se stiamo cercando un gene che fornisce una certa caratteristica (es. sintesi di un amminoacido) si può selezionare il clone sulla base di questa.

Es. piastratura su mezzo minimo (soltanto i ricombinanti con il clone di interesse possono sopravvivere)

2. *Identificazione del clone*

Si tratta di separare diverse colonie, generate da cloni diversi, e verificare quale ha la sequenza di interesse.

Es. metodo che si basa sull'ibridazione del gene (ibridi di RNA). Avendo le colonie sulla piastra in cui ogni colonia ha frammenti diversi, posso trasferire le colonie su una membrana (di microcellulosa o nylon), dopo di che degrado le cellule e purifico il DNA (trattando con soda e proteasi), a questo punto faccio come un blot, tratto la membrana con una sonda che si lega con la sua sequenza complementare e indicherà quale colonia contiene la sequenza che sto cercando.

Si usano delle sonde non radioattive, composte da nucleotidi modificati (es. tramite l'aggiunta di biotina - biotinilazione - una vitamina che ha la caratteristica di essere legata fortemente alla streptavidina che è marcata con un fluoroforo). Un altro sistema è una sonda marcata direttamente con perossidasi, che poi viene identificata tramite chemoluminescenza.

PRODUZIONE DI UNA LIBRERIA DI cDNA

- a) sintesi del primo filamento
- b) degradazione dell'RNA
- c) sintesi del secondo filamento
- d) legatura in un vettore
- e) trasformazione

(vedere il video di quello sul genoma)

Sintesi di Oligonucleotidi con una Sequenza Specifica - Sintesi di una sonda

Quando si parla di sonde, si parla di oligonucleotidi con una Sequenza Specifica: disegno a tavolino una sequenza complementare a quella di mio interesse.

Come faccio ad ottenerla?

Si utilizza un metodo che si basa sulla sintesi di gruppi protettivi:

si fa un supporto su base solida (insolubile, ad esempio silice) e si fa reagire il primo nucleotide che è l'ultimo della mia sequenza. La sua estremità 5' è protetto da un gruppo protettivo (fanno sì che il gruppo funzionale non riesca a reagire ma attraverso una modifica delle condizioni viene rimosso e sia libero e in grado di reagire). Quindi si prende il secondo (che ha entrambi le estremità protette) e si creano le condizioni per far deproteggere il 3' (così ho il 3' e 5' liberi così da farli reagire) e ricomincio. Così creo la sequenza che mi serve.

METODO SANGER PER IL SEQUENZIAMENTO DI DNA

È il metodo classico almeno per i frammenti classici, è un metodo basato sulla PCR: si parte da un template, con un primer che si appaia prima della regione da sequenziare, si divide in 4 reazioni di PCR, aggiungendo 3 nucleotidi modificati (dideoxinucleotidi, gli manca un ossidrile) quindi ogni tot. viene interrotto il frammento. Il risultato finale è che la PCR dà una serie di bande diverse, lunga ciascuna fino ad una copia di un nucleotide modificato. Così ho frammenti in cui so dove terminano e so qual è il determinato nucleotide. Tutte le bande differiscono per un singolo nucleotide. La differenza oggi è che il nucleotide che interrompe, contiene un fluoroforo diverso a seconda del nucleotide, quindi a seconda del colore posso identificare qual è la base con un'unica reazione di PCR, in cui statisticamente ci sono tutte le bande di interruzione. Si fa un'elettroforesi capillare, sulla base delle dimensioni, così da avere man mano frammenti più lunghi che costituiscono la sequenza, individuabile dai colori.

Altri: Next Generation Sequencing, ecc.

LEZIONE 8

Produzione di proteine a partire da geni clonati

Proteine ricombinanti

- Studio attività, struttura e funzione, produzione di mutanti.
- Applicazioni terapeutiche (insulina, fattori di crescita etc.).
- Enzimi per applicazioni industriali.

Sono proteine che vengono prodotte a partire da geni clonati. Io voglio studiare una proteina: come la ottengo? Ci sono due modi:

-la prendo e la purifico dalla sua fonte naturale

fattibile solo se la fonte naturale è accessibile, e devo avere a disposizione una serie di tecniche che mi rendano in grado di purificare questa proteina (questo problema è tanto più difficile quanto meno è abbondante la proteina)

-produzione di proteine ricombinanti facendola produrre da un altro organismo

Recupero il gene che codifica per essa dall'mRNA, lo si retrotrascrive a cDNA, e gli si può introdurre, digerendolo con un enzima, in un vettore per clonarlo.

Ci vogliono plasmidi con caratteristiche ben precise. Faccio crescere la cellula che contiene il gene estraneo ed esprime la proteina, esistono una serie di metodi per far sì che sia più facile anche purificare la proteina, aggiungendo dei Tag. Tramite queste tecnologie posso studiare anche dei mutanti che in natura non esistono.

Sistemi di espressione

A seconda del vettore che si utilizza si possono avere dei sistemi di espressione:

- *Procarioti* (*E. coli*)
- *Eucarioti*
 - Lieviti (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*)
 - Cellule di insetto/baculovirus
 - Cellule di mammifero

ci sono quindi colture cellulari di mammiferi ingegnerizzate (molto costose e più complicati, però a volte necessari).

Il tipo di coltura può anche essere differente:

Coltura in batch

Recipiente di coltura chiuso: abbiamo una beuta con un certo volume di coltura che cresce -> centrifugazione -> preparazione del prodotto: dal mezzo o dalle cellule, a seconda che la proteina sia secreta o intracellulare.

Coltura continua

Un agitatore tiene in movimento un grande volume di colture (scala industriale): c'è una continua immissione di mezzo fresco e contemporaneamente prelievo di mezzo e cellule per poter preparare il prodotto.

ESPRIMERE PROTEINE ANIMALI IN BATTERI

Il vettore ingegnerizzato (che porta il gene che codifica per una determinata proteina) viene immesso in un batterio, anch'esso ingegnerizzato geneticamente che sintetizza la proteina.

In realtà ci sono una serie di problemi che limitano il processo, rendendolo meno lineare ma che è possibile bypassare.

Per esprimere una proteina animale in una cellula batterica, si deve tenere conto che i sistemi di espressione e regolazione sono completamente diversi. Devo quindi prelevare solo la sequenza codificante, senza promotori o terminatori, e introdurla in un sistema che mi permetta di avere un sito di legame al ribosoma batterico e un terminatore batterico. Il plasmide deve avere un promotore, un sito di legame, un polylinker, e un terminatore (tutti batterici) così da poter trascrivere la proteina all'interno della cellula batterica usando i segnali propri dei procarioti ->

Vettori di espressione

Per l'espressione eterologa, bisogna inserire la sequenza codificante sotto il controllo di elementi (promotore, Ribosome Binding Site, terminatore) utilizzati da *E. Coli*.

Si utilizzano vettori di espressione (es. pQE50 o pETs).

L'elemento fondamentale che regola l'espressione della proteina è il promotore. Esistono diversi tipi di promotori

Promotori batterici:

- *forti o deboli*

A seconda di quanto viene trascritto il gene che è controllato da questo gene.

- *costitutivi o inducibili (e reprimibili)*

Che producano la proteina sempre o a seconda di fattori esterni.

Spesso meglio usare un promotore meno forte ma con una qualità migliore, si tendono però (in E.Coli) a usare promotori forti e regolabili (di tipo inducibile), perché ci interessa produrre delle proteine in determinati momenti (ad esempio non far produrre una proteina tossica quando stanno ancora crescendo).

Alcuni promotori comunemente utilizzati nei vettori di espressione:

-lac (particolarmente utilizzato, è inducibile tramite lattosio)

-trp (indotto da acido 3 b indolacrilico)

-T7 (tramite IPTG) ed è un promotore di un fago, il fago T7

-lambdaPL (aumenta o diminuisce a seconda della temperatura)

La sequenza del promotore, che è parzialmente sovrapposta all'operatore, a sua volta bloccato dal repressore. Nel momento in cui c'è il lattosio, si stacca il repressore e parte la trascrizione. Un sistema molto comune utilizza la combinazione dei promotori Lac e T7 con IPTG come induttore, in grado di legarsi al repressore e staccarlo dal promotore ma non è metabolizzabile dai batteri, quindi il repressore non torna a legarsi all'operone. Quindi l'induzione diventa costitutiva. Utilizzando sia Lac che T7, la polimerasi del fago T7 esprime moltissimo il gene: si utilizzano dei batteri (ceppi di E.Coli modificati) che hanno all'interno del loro genoma la sequenza della polimerasi del fago, sotto il controllo dell'operone Lac. Quindi per indurre la sintesi della proteina:

-fornisco IPTG alle cellule, questo si lega al promotore Lac, che si libera e trascrive il gene della polimerasi T7, che una volta prodotta, trascriverà il gene regolato dal promotore T7.

È un sistema più complicato che mi permette di esprimere quantità molto alte di proteine.

Costrutti per l'espressione di proteine di fusione

Le proteine di fusione sono versioni modificate della proteina in cui si aggiungono o tolgono dei pezzi per migliorarne l'espressione, le quantità prodotte o, utilizzando dei tag, di facilitarne la purificazione.

Il segmento può essere un gene di E. coli per facilitare l'inizio della traduzione oppure un tag (es 6XHIS, come in pQE50 o la GST (glutazione S-transferasi)) che si utilizzerà per la purificazione della proteina tramite cromatografia di affinità.

Se il plasmide è stato modificato e ho la sequenza di un'altra proteina normalmente espressa da E.Coli, devo avere una fusione corretta altrimenti il gene non viene letto. Con la fusione

corretta posso ottenere però una proteina con un segmento della proteina iniziale. Questo sistema viene utilizzato per inserire i tag:

i tag più comuni si basano sul tag di istidine o sulla GST (enzima ad affinità molto alta per il glutathione).

Come funziona?

Viene ingegnerizzato il gene in maniera che la il gene di GST, il gene del linker ha una sequenza di una proteina di interesse (solitamente proteasi), ottengo quindi la GST, un linker e la proteina. Nel linker c'è una sequenza che permette di usare la proteasi.

Dato che la GST si lega al glutathione posso usare questa cosa per estrarre la proteina di interesse dalle altre: **CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ**.

si basa sull'utilizzo di una resina, in una colonna con una frazione fissa non solubile, costituita da sfere di polinero (tipo agarosio) a sua volta a cui è stato aggiunto molecole di glutathione. Liscio il batterio, estraggo le proteine e le carico sulla colonna. Siccome la proteina GST ha grande affinità per il glutathione, rimarrà attaccata alla resina, mentre il resto no, lavando un po' la resina viene rimosso il superfluo. Successivamente si aggiunge una soluzione con un'alta quantità di glutathione libero, che fa in modo di poter staccare la GST dalla resina con la proteina attaccata. Così ottengo la proteina pura. Se poi la GST è legata ad un linker che ha un sito per la proteasi, aggiungo proteasi e taglio anche la GST, ottenendo la proteina.

Tag di istidine

Si fa in modo che la proteina venga espressa con un terminale di istidine (6 è il numero minimo). Posso usarlo sempre con una cromatografia di affinità che si basa sulla formazione di un composto di coordinazione con il Nikel.

Esistono dei composti di coordinazione tra agenti chelanti e metalli, la resina viene quindi derivatizzata con gruppi chelanti che permettono di coordinare uno ione: quindi ottengo una resina a cui viene legato il nikel, a questo punto faccio passare l'estratto batterico e la proteina con istidine in tandem e si lega al nikel. A questo punto aggiungo qualcosa che mi fa staccare le proteine, in questo caso è più vantaggioso perché le istidine sono più piccole. Esistono altri sistemi di espressione con altri tag.

Posso anche esprimere proteine mutate: studio delle versioni mutate della proteina per vedere in che modo si comporta, semplicemente modificando la sequenza (si può modificare in ogni modo la proteina)

Problemi generali per quanto riguarda le proteine in E. coli

a) non può rimuovere gli introni - come tutti i batteri nella maggior parte dei casi.

Per esprimere proteine in E. coli si deve partire da cDNA che rappresenta solo la sequenza codificante (senza introni).

b) terminazione prematura della trascrizione

potrebbero esserci delle sequenze che il batterio interpreta in modo errato (ad esempio sequenze che somigliano a sequenze di terminazione batteriche producendo una proteina trunca e non funzionale)

c) propensione per un codone

la frequenza di utilizzo dei codoni non è la stessa per eucarioti e procarioti. Quindi avendo diverse frequenze (alcuni hanno più tRNA per alcuni codoni che per altri) il batterio fa più fatica: sono stati creati dei plasmidi accessori, trasformando le cellule con due plasmidi diversi, codificano per i cosiddetti codoni rari.

Inoltre spesso la proteina espressa non si ripiega correttamente e si ritrova sotto forma di aggregati insolubili chiamati corpi di inclusione. Ciò è dovuto all'incapacità dei procarioti, in alcuni casi, di favorire il "folding" di proteine di origine eucariotica:

A volte c'è bisogno di chaperoni o di meccanismi molecolari che aiutano il ripiegamento, che nei procarioti non c'è. In alcuni casi esiste un sistema parziale per recuperare questa proteina (protein refolding):

recupero i corpi di inclusione, li solubilizzo con un agente caotropico (che rompe tutte le strutture secondarie) e tramite una serie di tecniche con cui rimuovo lentamente il denaturante e aggiungendo degli additivi chimici, amminoacidi, detergenti e zuccheri (in mancanza degli chaperoni), potrei riuscire a ottenere la proteina nella forma nativa, ma spesso la proteina riaggrega e riforma i corpi di inclusione e in quel caso c'è poco da fare, bisogna cambiare sistema di espressione.

Espressione in organismi eucarioti inferiori

Si utilizzano promotori inducibili di geni eucarioti.

I lieviti sono la prima scelta alternativa ai procarioti: i lieviti hanno il vantaggio di essere unicellulari e crescono sui terreni di coltura dei batteri, ma essendo eucarioti ne hanno comunque le caratteristiche trascrizionali.

Per poter esprimere una proteina in un lievito ho ovviamente bisogno dei suoi promotori:

i più utilizzati sono GAL, AOX, la glucoamilasi, ecc.

Anche i funghi filamentosi possono essere utilizzati (promotore della celobioidrolasi)

I sistemi di espressione eucarioti permettono di ottenere le **modifiche post-traduzionali** (es. fosforilazione, glicosilazione ecc.) anche se a volte con risultati leggermente diversi tra i vari organismi. Essendo comunque lieviti, non modificano la proteina come lo farebbe la cellula d'origine, quindi a volte c'è bisogno di usare cellule di animali, che hanno meccanismi più sofisticati.

Espressione in cellule animali

Il sistema più comune utilizza cellule di insetto infettate con baculovirus, non sono mammiferi ma sono molto più simili ad esso. Si utilizzano baculovirus (infettano epidermici provocando malattie infettive che sono innocui per i mammiferi) modificati con il gene di interesse e si infettano cellule di insetto in coltura che produrranno la proteina di interesse.

Come funziona il sistema di espressione in questo caso?

Queste cellule incorporano il genoma virale e cominciano a produrre dei virus che infettano tutte le cellule, producendo anche la proteina di interesse. Questo tipo di approccio è ovviamente più

costoso e più difficile, però posso produrre dei tipi di proteine che non riesco ad avere con gli altri.

Espressione in vivo di animali

Proteine prodotte attraverso la clonazione: prendo il genoma di una cellula, e lo introduco in un'altro tipo di cellula a cui è stato tolto il nucleo (da ovocita) e poi inserito in una madre surrogata. Se io modifico prima di inserirlo, il genoma, posso ottenere la proteina di interesse in un organismo transgenico.