

Per «tagliare e incollare» il DNA si utilizzano particolari enzimi

- Gli strumenti per ottenere DNA ricombinante sono:
- enzimi batterici chiamati **enzimi di restrizione** che riconoscono brevi sequenze di nucleotidi del DNA e le tagliano in punti precisi;
- l'enzima **DNA-ligasi** che incolla le estremità dei filamenti di DNA catalizzando la formazione di legami covalenti.

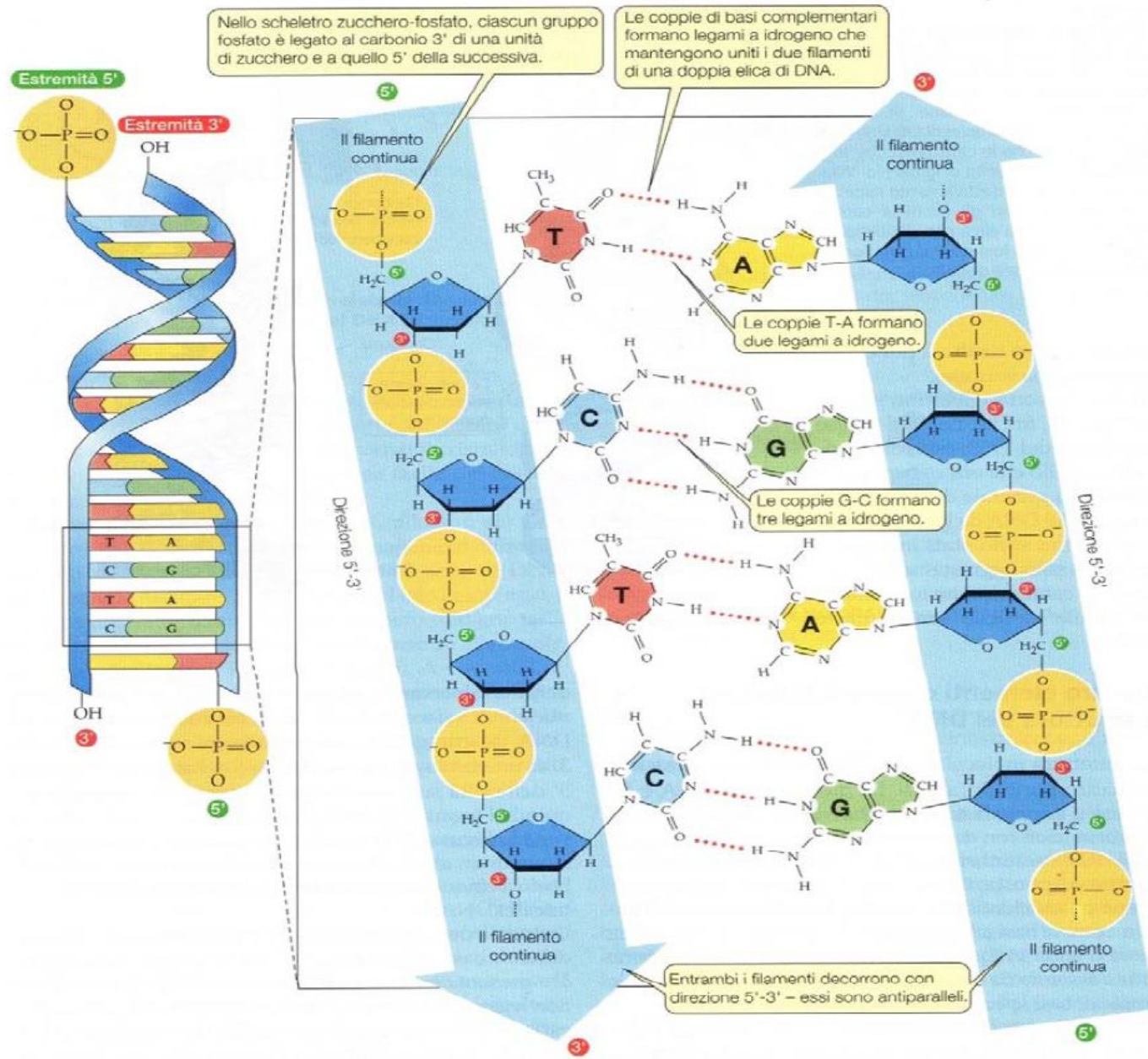
Enzimi di restrizione

Sono strumenti importantissimi dell'ingegneria genetica perché permettono di tagliar in modo controllato il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche .

Si tratta di endonucleasi ,enzimi in grado di scindere i legami fosfodiesterici interni alla doppia elica del Dna.

Gli enzimi di restrizione sono stati isolati da diversi batteri nei quali svolgono un'azione di protezione all'introduzione di Dna estraneo, ad es. da parte dei fagi.

Struttura Dna



Enzimi di restrizione

Gli enzimi riconoscono sequenze specifiche composte da 4 a 8 basi. → più è corta la sequenza e più è presente

Un particolare sito di 4 paia di basi ricorre in media ogni 256 paia di basi mentre un sito di 6 paia di basi ricorre ogni 4096 paia di basi.

Ma la distribuzione dei siti non è regolare, per cui una particolare regione di Dna può essere tagliata con una frequenza più o meno alta della media statistica.

Endonucleasi di tipo II

Nelle tecnologie del DNA ricombinante vengono ampiamente utilizzate endonucleasi di tipo II, nelle quali la sequenza riconosciuta dall'enzima coincide con quella effettivamente tagliata.

Le sequenze di classe II sono sequenze palindromiche del tipo:

5'.....GGTACC.....3'

3'.....CCATGG.....5'

Nomenclatura degli enzimi di restrizione

Il nome dell'enzima di restrizione ci indica da quale organismo essi sono stati isolati. Ad esempio l'enzima *EcoRI* proviene dal ceppo di *Escherichia coli*.

Regole:

E = genere *Escherichia* (genere a cui appartiene l'organismo)

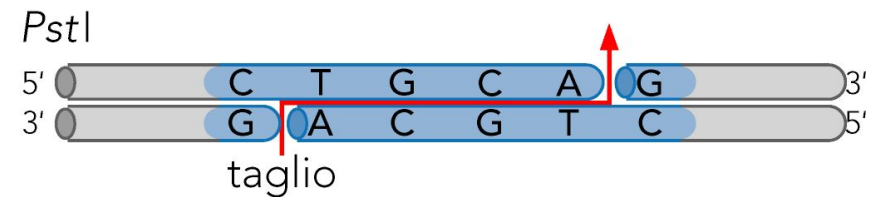
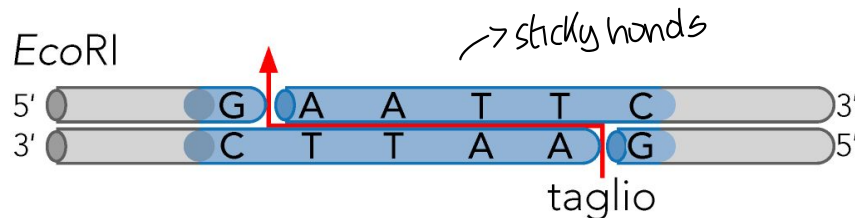
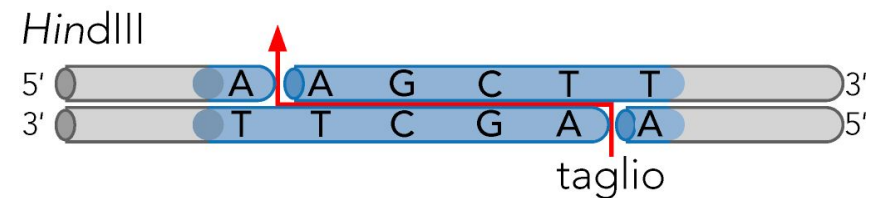
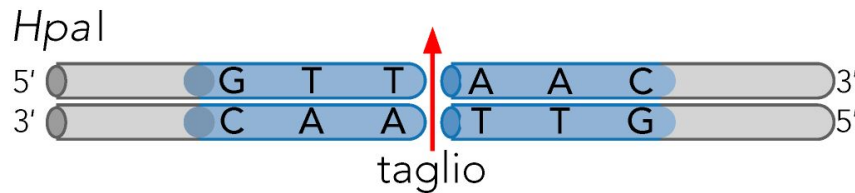
Co = specie *coli* (seconda e terza lettera derivano dalle iniziali della specie)

R = Ceppo *RY13*

I = prima endonucleasi isolata (numero romano indica l'ordine di isolamento delle varie endonucleasi dello stesso organismo)

Le Endonucleasi di Restrizione (II)

Enzima	Sito di riconoscimento	
EcoR I	G A A T T C C T T A A G	Escherichia coli
HPa I	G G A T C C C C T A G G	Haemophilus parainfluenzae
Hind III	A A G C T T T T C G A A	Haemophilus influenzae
Pst I	CTGCAG GACGTC	Providencia Stuarti



Enterobatteri

Escherichia coli, Providencia Stuarti

Gli **Enterobatteri**, includono un numero ampio di [batteri](#), il cui *habitat* naturale è costituito dall'intestino dell'[uomo](#) e di altri animali

Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli [Gram-negativi](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, [asporigeni](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, asporigeni. Possono essere mobili o immobili, quasi tutti provvisti di [pili](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, asporigeni. Possono essere mobili o immobili, quasi tutti provvisti di pili. Sono Aerobi-anaerobi facoltativi e normali [terreni di coltura](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, asporigeni. Possono essere mobili o immobili, quasi tutti provvisti di pili. Sono Aerobi-anaerobi facoltativi e normali terreni di coltura consentono la loro crescita. Se coltivati in presenza di ossigeno, ovvero in aerobiosi, gli enterobatteri sono produttori di [citocromi](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, asporigeni. Possono essere mobili o immobili, quasi tutti provvisti di pili. Sono Aerobi-anaerobi facoltativi e normali terreni di coltura consentono la loro crescita. Se coltivati in presenza di ossigeno, ovvero in aerobiosi, gli enterobatteri sono produttori di citocromi e attraverso il [ciclo di Krebs](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, asporigeni. Possono essere mobili o immobili, quasi tutti provvisti di pili. Sono Aerobi-anaerobi facoltativi e normali terreni di coltura consentono la loro crescita. Se coltivati in presenza di ossigeno, ovvero in aerobiosi, gli enterobatteri sono produttori di citocromi e attraverso il ciclo di Krebs ricavano energia ossidando l'[acido piruvico](#) Tutti gli Enterobatteri sono bastoncelli Gram-negativi, asporigeni. Possono essere mobili o immobili, quasi tutti provvisti di

Haemophilus

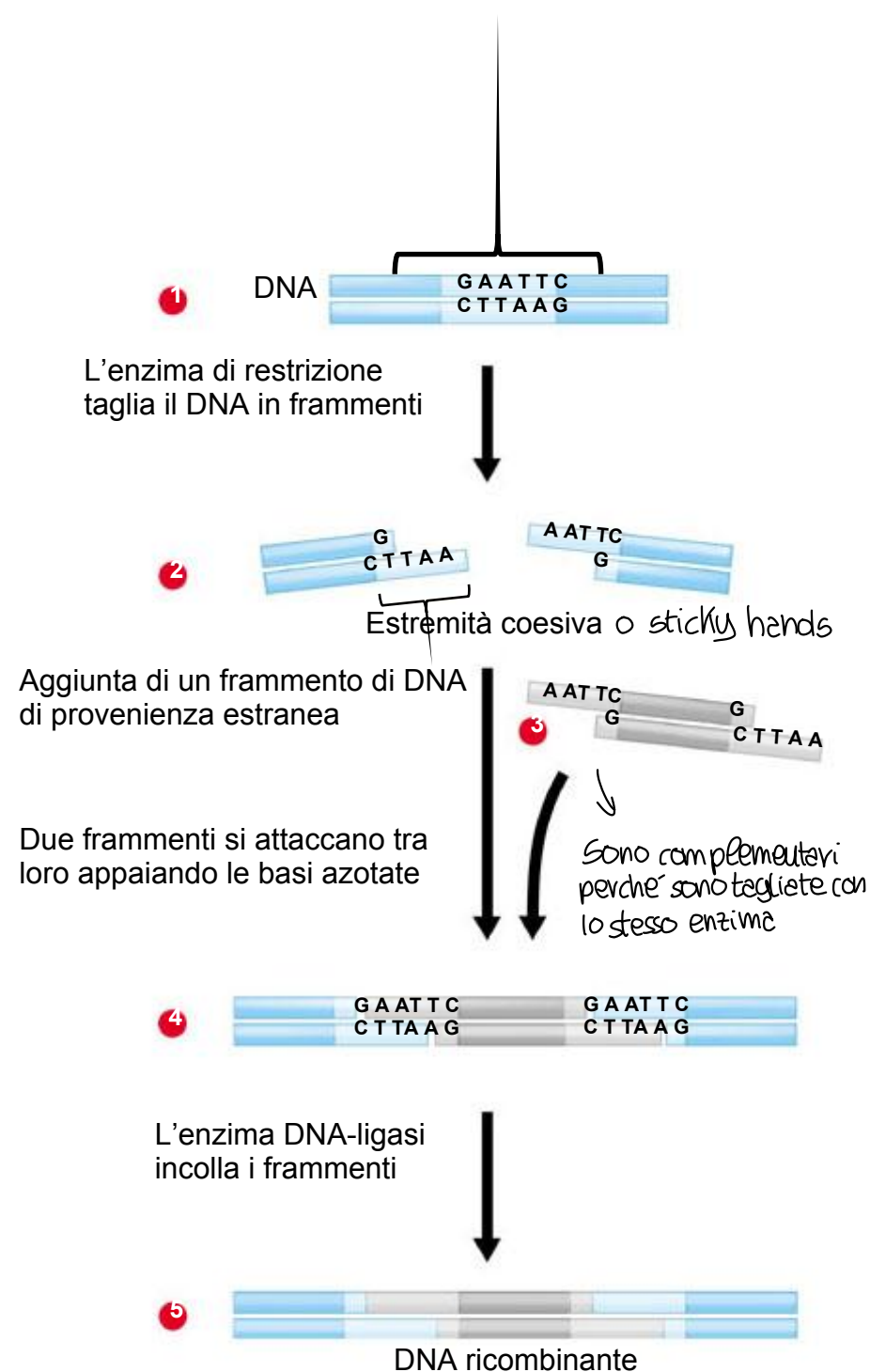
Il genere ***Haemophilus*** comprende piccoli [batteri](#) comprende piccoli batteri Gram-negativi, con spiccato [pleiomorfismo](#) comprende piccoli batteri Gram-negativi, con spiccato pleiomorfismo (forme bacillari, cocco-bacillari o filamentose) immobili, asporigeni, aerobi-anaerobi facoltativi. Per il loro sviluppo su terreni di coltura sono necessari due fattori indispensabili chiamati "fattore X" e "fattore V". Questi fattori sono, rispettivamente, il [gruppo EME](#) comprende piccoli batteri Gram-negativi, con spiccato pleiomorfismo (forme bacillari, cocco-bacillari o filamentose) immobili, asporigeni, aerobi-anaerobi facoltativi. Per il loro sviluppo su terreni di coltura sono necessari due fattori indispensabili chiamati "fattore X" e "fattore V". Questi fattori sono, rispettivamente, il gruppo EME (necessario alla sintesi dei citocromi) ed il [coenzima NAD](#) e NADP. Gli Emofili sono in grado di sintetizzare autonomamente questi fattori, presenti normalmente nel sangue fresco

Haemophilus influenzae deve il proprio nome all'errore di essere stato inizialmente riconosciuto come il micorganismo responsabile dell'[influenza](#), che oggi sappiamo avere un'origine virale. Rispetto all'influenza, le infezioni da *Haemophilus influenzae* sono assai più temute, perché potenzialmente molto gravi, soprattutto nei bambini. *Haemophilus influenzae* è un patogeno scarsamente invasivo, peculiare dell'essere umano, che colonizza abitualmente le mucose delle prime vie aeree di molti adulti, soprattutto nei mesi invernali, senza causare particolari malattie. Sebbene sia riscontrabile nell'80% degli adulti sani, di regola l'infezione viene circoscritta dal sistema immunitario e decorre in maniera asintomatica. Quando le linee di difesa dell'organismo vengono compromesse da particolari condizioni

Modalità d'azione

Gli enzimi come *Hind*II tagliano Dna al centro dei loro siti di riconoscimento in modo da produrre frammenti a estremità piatte, le cui basi sono appaiate sino alla fine e non hanno tendenza a aderire tra di loro. Al contrario, l'enzima *Eco*RI effettua tagli sfalsati che producono all'estremità di ciascun frammento brevi code a singola elica costituite da quattro basi.

Le code complementari a singola elica tendono ad associarsi mediante appaiamento e sono denominate estremità coesive (sticky). I frammenti tenuti insieme mediante appaiamento di basi possono essere congiunti in modo permanente aggiungendo l'enzima DNA ligasi, che catalizza la formazione di nuovi legami fosfodiesterici.



Plasmidi

A partire dagli anni settanta vennero prodotti in fabbrica plasmidi sulla base di quelli esistenti in natura, aggiungendo frammenti di DNA presi da altri organismi, batteri e non.

Successivamente il livello di "ingegnerizzazione" si è sofisticato sempre di più, tanto che oggi si trovano in commercio plasmidi del tutto artificiali.

Oltre ai plasmidi batterici (come pBR322) vengono utilizzati per costruire plasmidi anche cromosomi di virus che normalmente infettano i batteri (per esempio Lambda o M13), perchè essi sono in grado di inserirsi nel cromosoma batterico e permettono di amplificare frammenti di DNA estraneo molto lunghi (fino a cinquantamila paia di basi).

Il termine plasmide si è quindi esteso a tutte quelle molecole usate come "trasportatori" di DNA, che si definiscono quindi anche vettori. I frammenti di DNA aggiunti in fabbrica sono necessari ad espletare specifiche funzioni, e devono essere disposti in un preciso ordine affinché le funzioni vengano espletate correttamente.

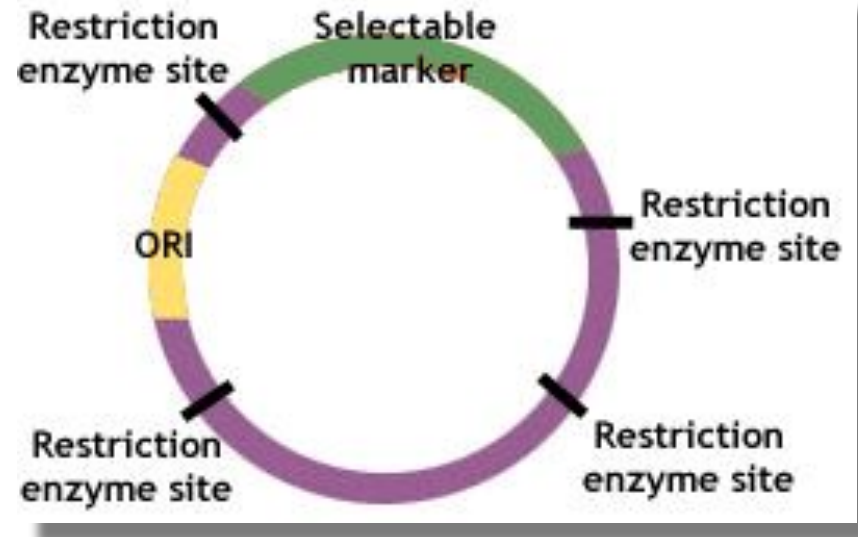
Innanzitutto vengono messi dei geni per la resistenza a vari antibiotici, che permettono di selezionare solo quei batteri che hanno ricevuto il plasmide.

I batteri trasformati con il plasmide contenente DNA estraneo vengono fatti crescere su terreni contenenti uno o più antibiotici, e così solo quelli che hanno il plasmide possono sopravvivere, mentre gli altri muoiono.

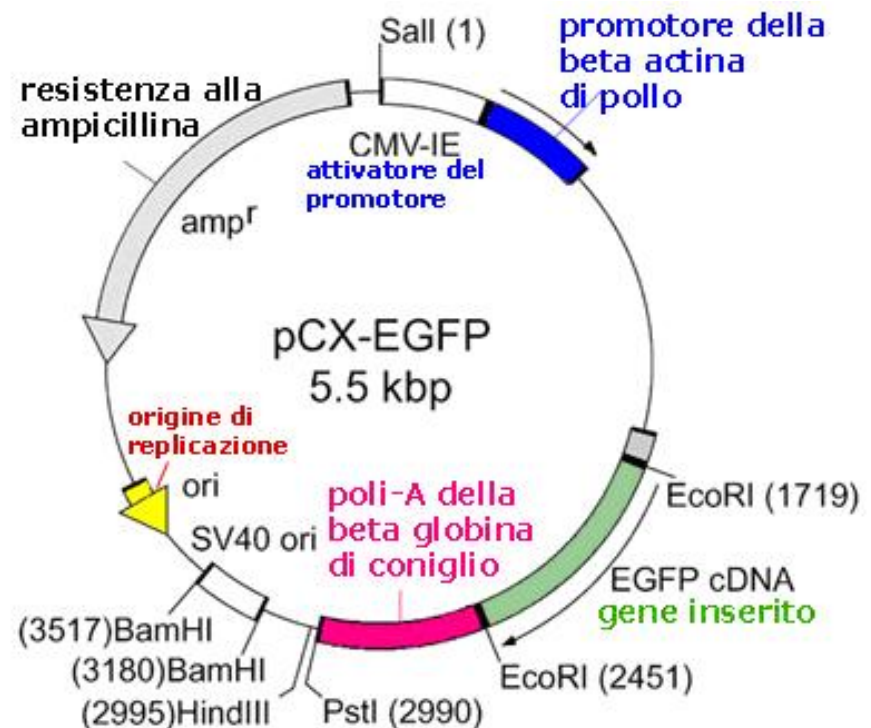
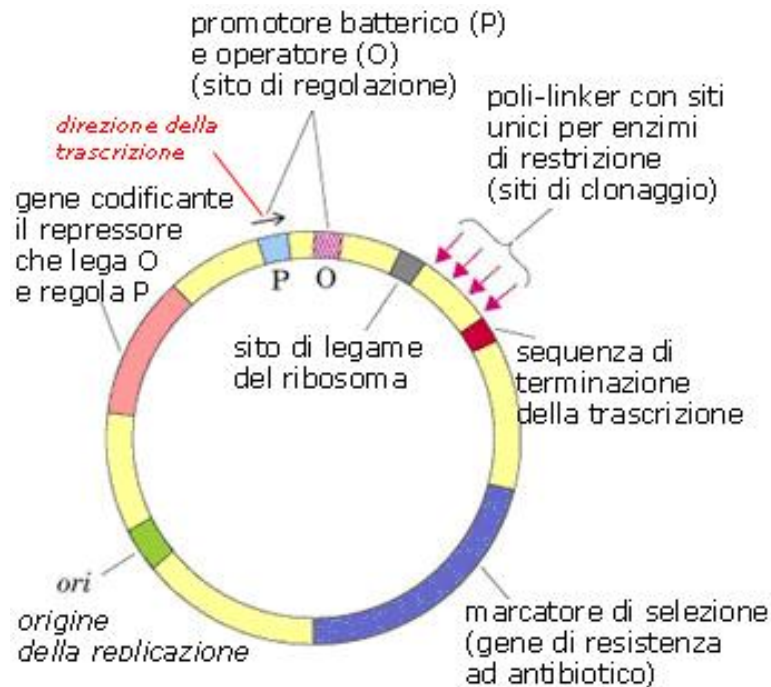
I geni per la resistenza agli antibiotici sono detti **marcatori di selezione**.

Altri frammenti aggiunti in fabbrica contengono delle sequenze che permettono il taglio del plasmide usando gli enzimi di restrizione.

Il ricercatore può così aprire il plasmide ed inserirvi il gene estraneo, a sua volta ottenuto grazie ad un taglio con lo stesso enzima di restrizione. In uno stesso plasmide vi possono essere più siti per diversi enzimi di restrizione



ci dicono se è stato
assorbito il segmento di DNA
o no



Qui vediamo uno schema generico di mappa di vettore di espressione genica, e la mappa di un vettore vero, il pCX-EGFPTM, lungo 5,5 kilobasi (kbp).

I numeri tra parentesi indicano il numero della base di inizio del gene o sito di restrizione indicato.

EcoRI, PstI, BamHI, Sall sono sigle che indicano i siti per gli enzimi di restrizione

Vi possono anche essere alcuni altri siti per enzimi di restrizione diversi da quelli per l'inserzione, e disposti in due zone del plasmide, da usare nel caso si volesse rimuovere il gene inserito.

Vi sono poi segnali necessari ad avviare la sintesi di RNA messaggero (mRNA), cioè la trascrizione, a partire dal gene estraneo, e segnali di avvio della traduzione di mRNA in catena polipeptidica.

La sequenza che serve da avvio della trascrizione si chiama promotore. Esso è una specifica sequenza di DNA che viene riconosciuta dall'enzima RNA polimerasi, e può derivare o da batteri, cioè da procarioti, se il DNA da utilizzare per la produzione di proteine è procariotico, oppure da eucarioti se i geni per le proteine da produrre provengono da organismi superiori diversi dai batteri.

Vi saranno poi dei segnali di stop dopo l'estremità 3' del gene inserito: prima lo stop della traduzione di mRNA in proteina, e poi lo stop della trascrizione in RNA, il terminatore, in modo da consentire la trascrizione di tutto il gene. Il terminatore è costituito da una breve sequenza palindromica posta 15-20 basi prima della fine del trascritto, e da una coda di poli-A.

Alcuni portano anche un gene per la luciferasi, una proteina fluorescente, derivante da batteri o insetti, che viene trascritta e sintetizzata insieme a quella di interesse; essa serve a dimostrare l'avvenuto giusto funzionamento del sistema di espressione.

Ciò permette una verifica immediata dell'espressione, direttamente sulle piastre di coltura delle cellule.

