

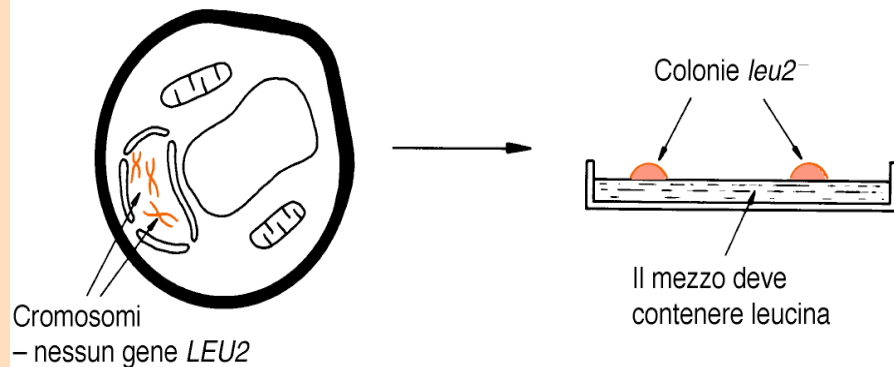
# Vettori non plasmidici e vettori per organismi eucarioti

- **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.)**

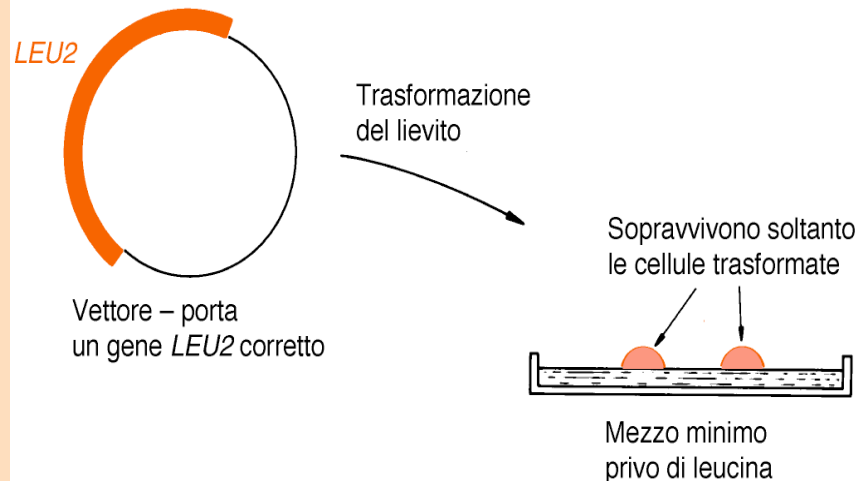
# Vettori per lieviti

**Plasmidi episomici di lievito (YE<sub>p</sub>) → possono esistere isolati o integrarsi in uno dei cromosomi per ricombinazione omologa**

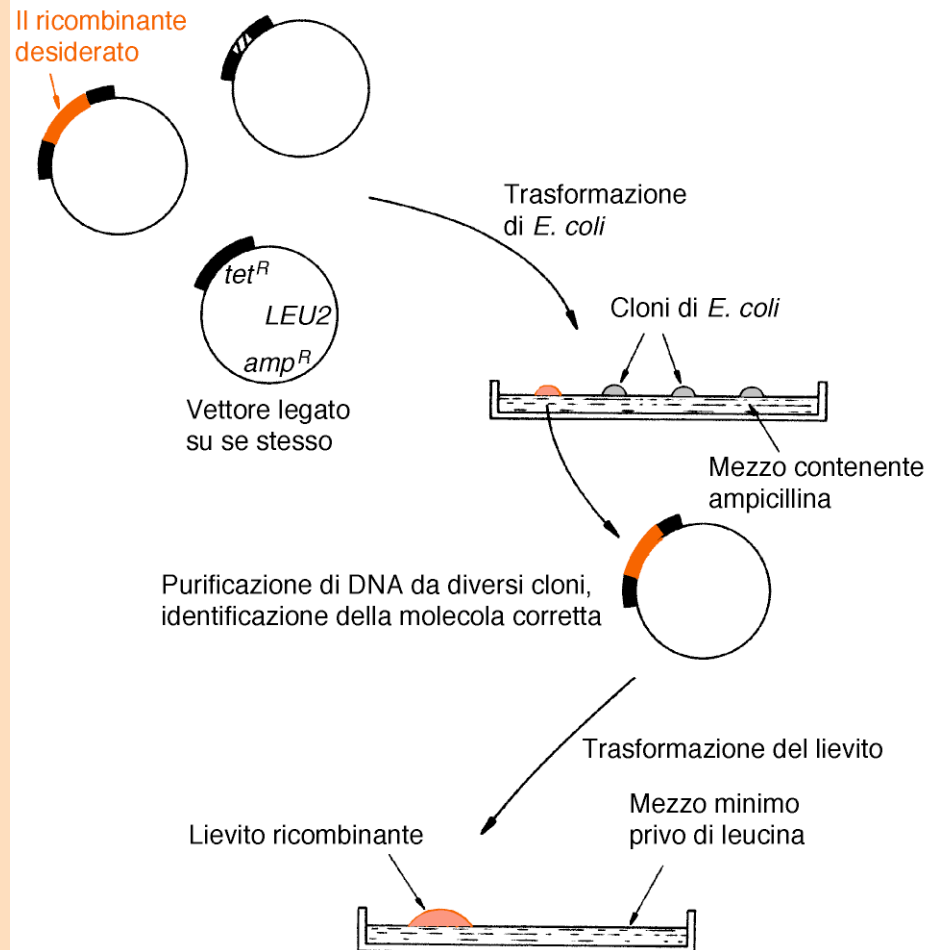
(a) Lievito *leu2<sup>-</sup>*



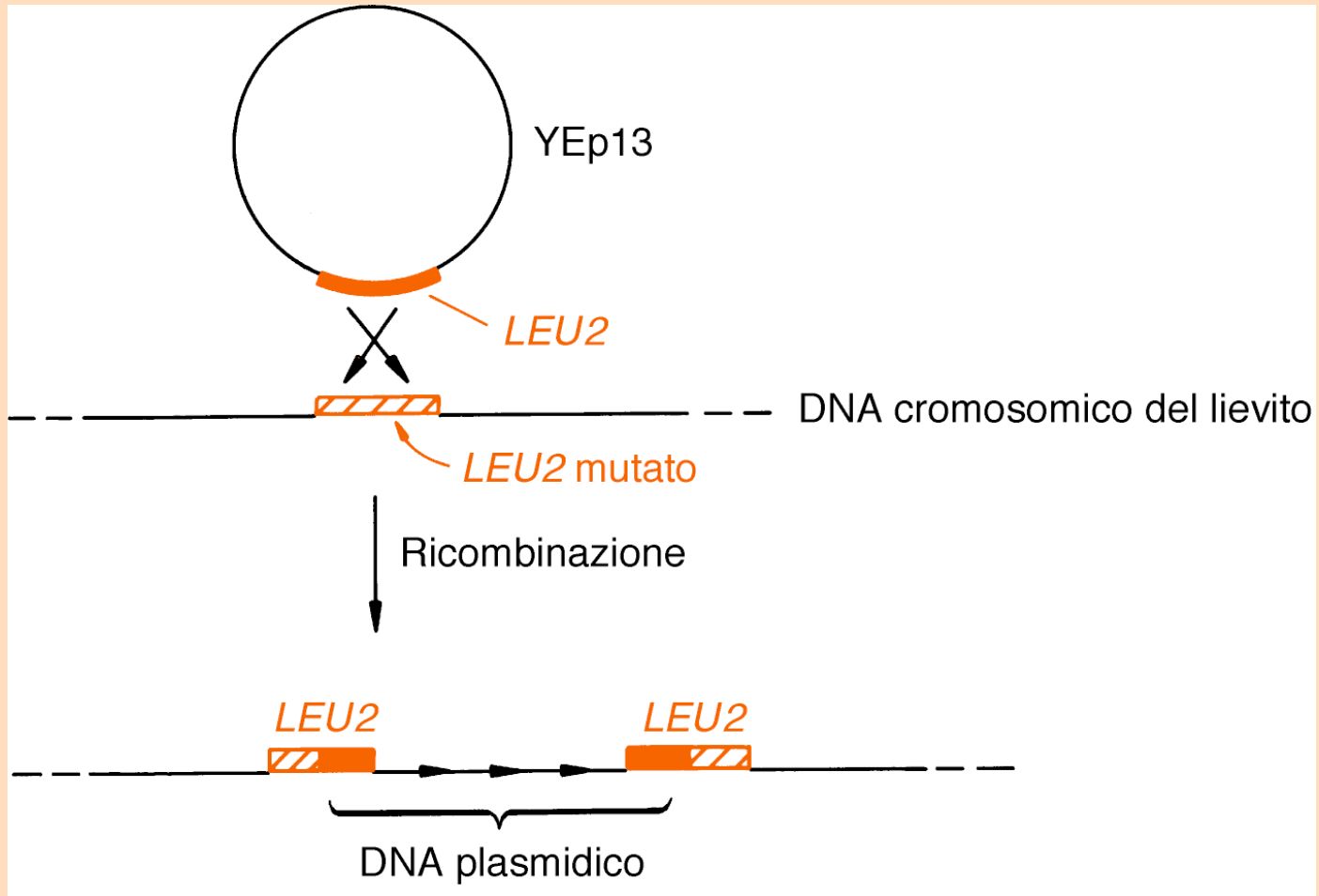
(b) Uso di *LEU2* come marcatore selezionabile



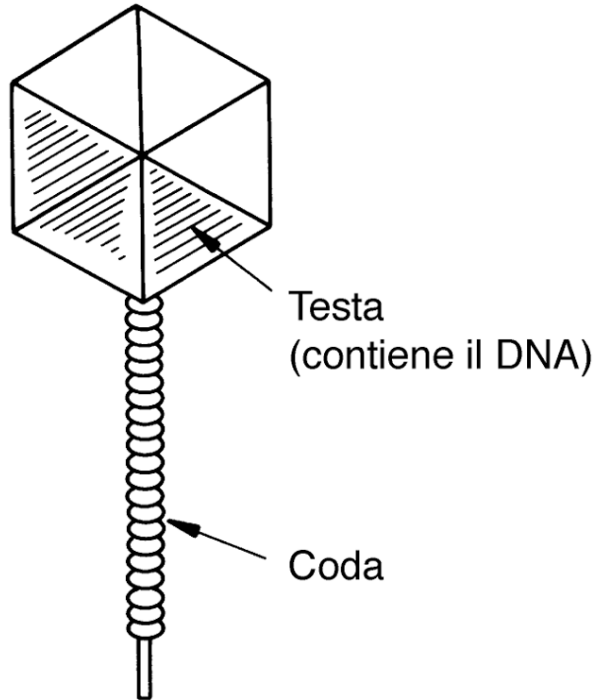
Molecole ricombinanti di YE<sub>p</sub>13



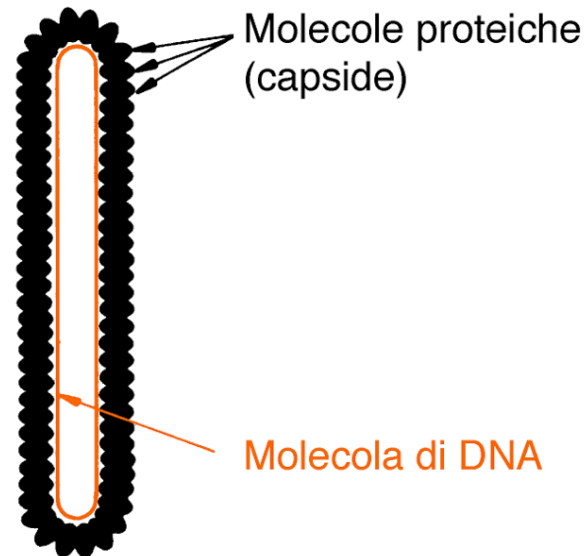
# Plasmidi integrativi di lievito (YIP)



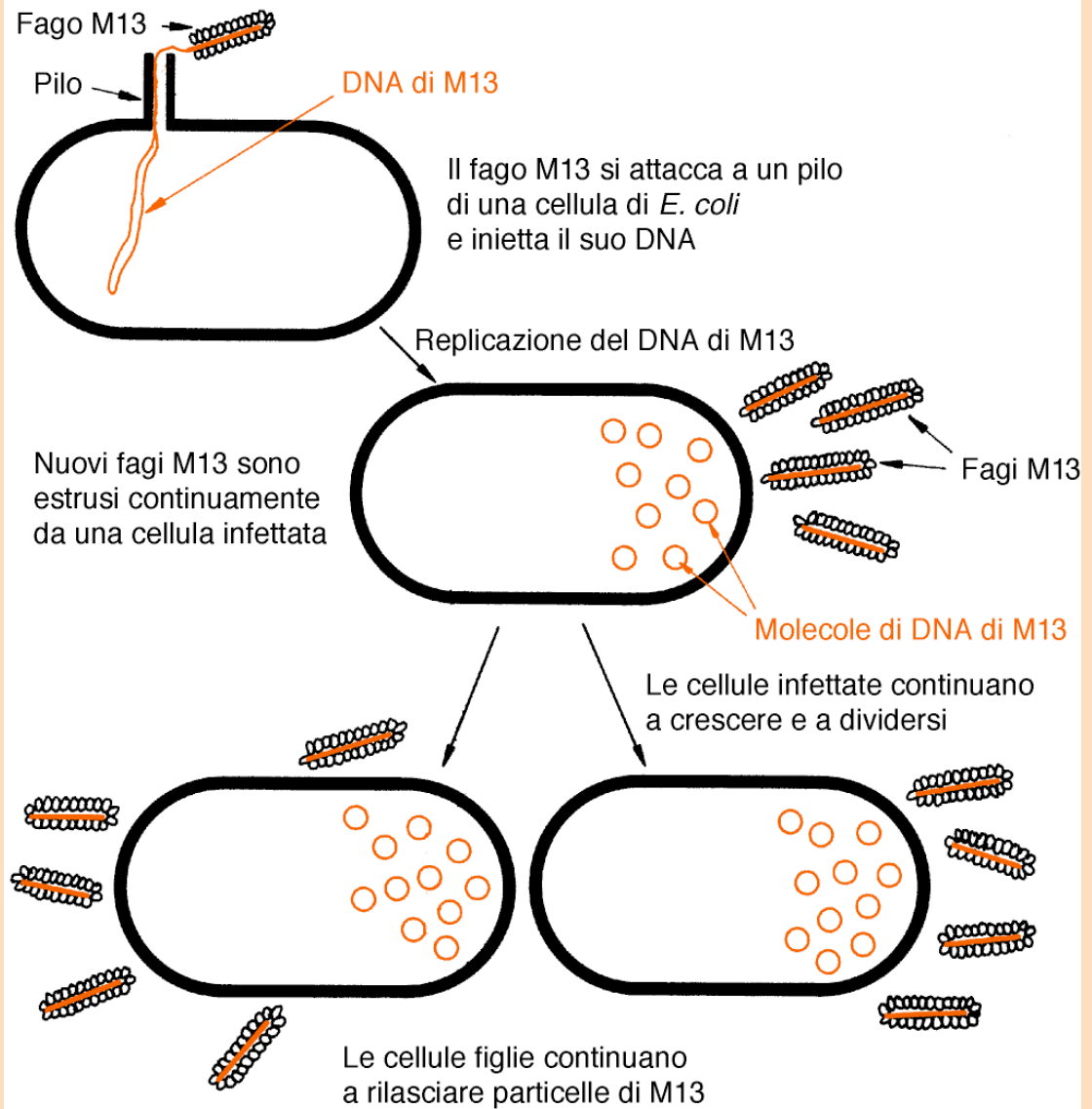
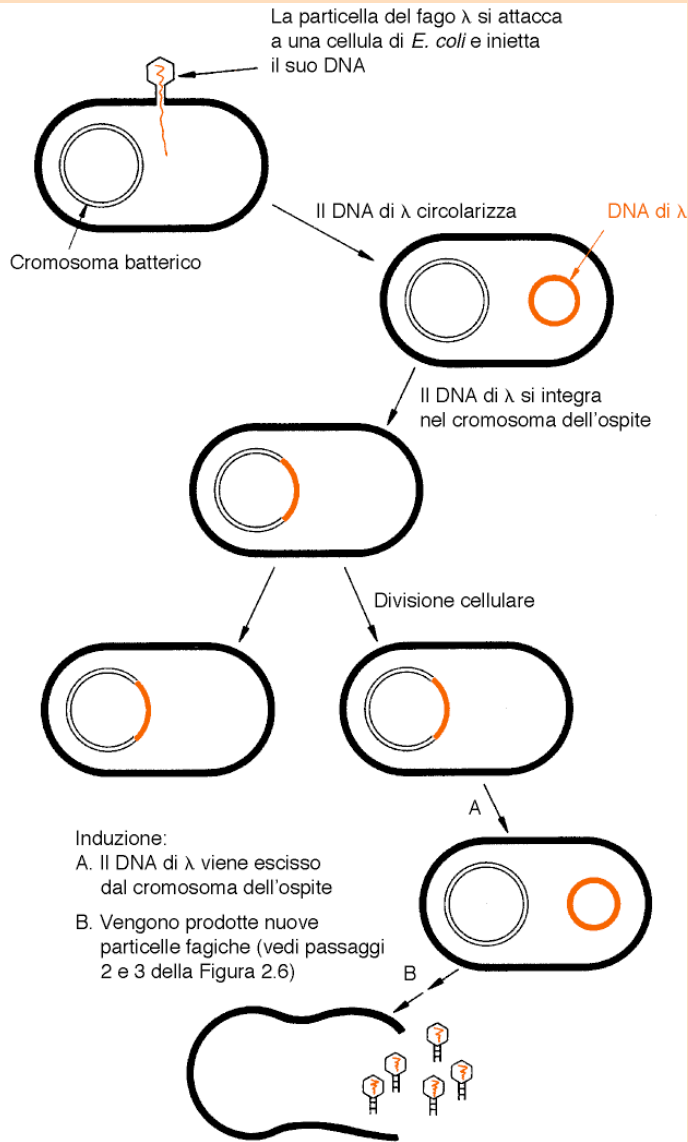
# Vettori derivati da Batteriofagi



(a) Testa-e-coda



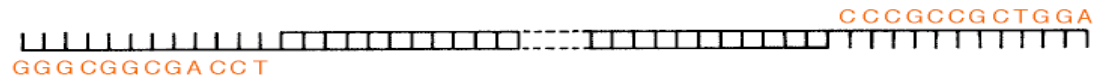
(b) Filamentosa



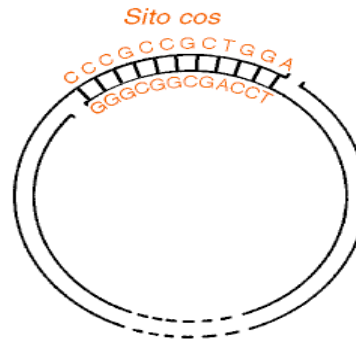
**(a) La forma lineare della molecola di DNA di  $\lambda$**

Estremità coesiva sinistra

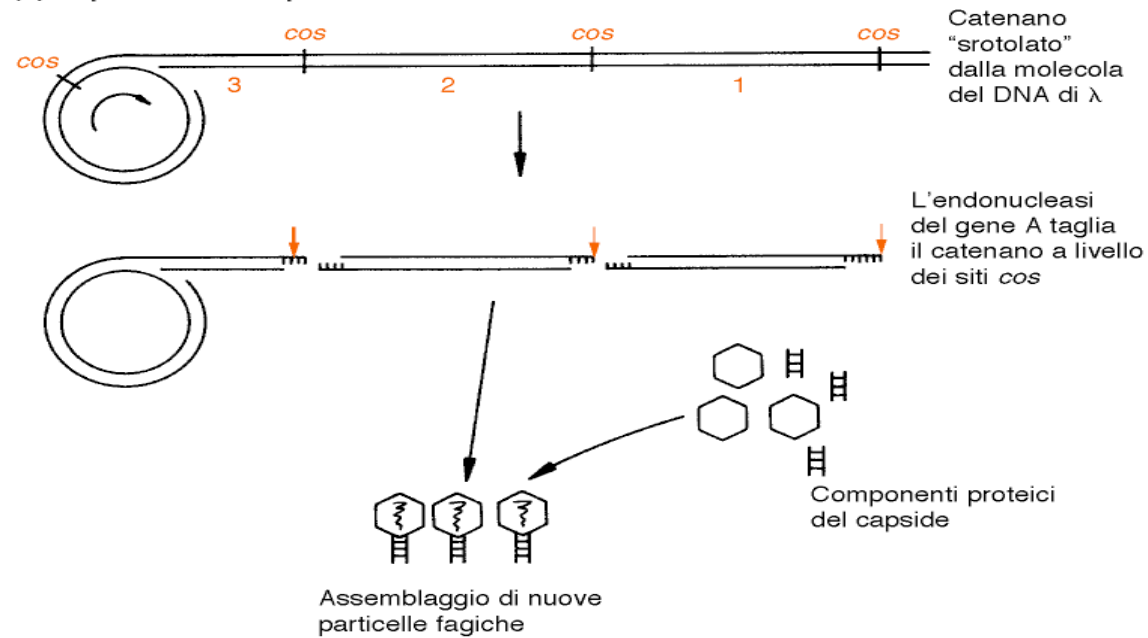
Estremità coesiva destra



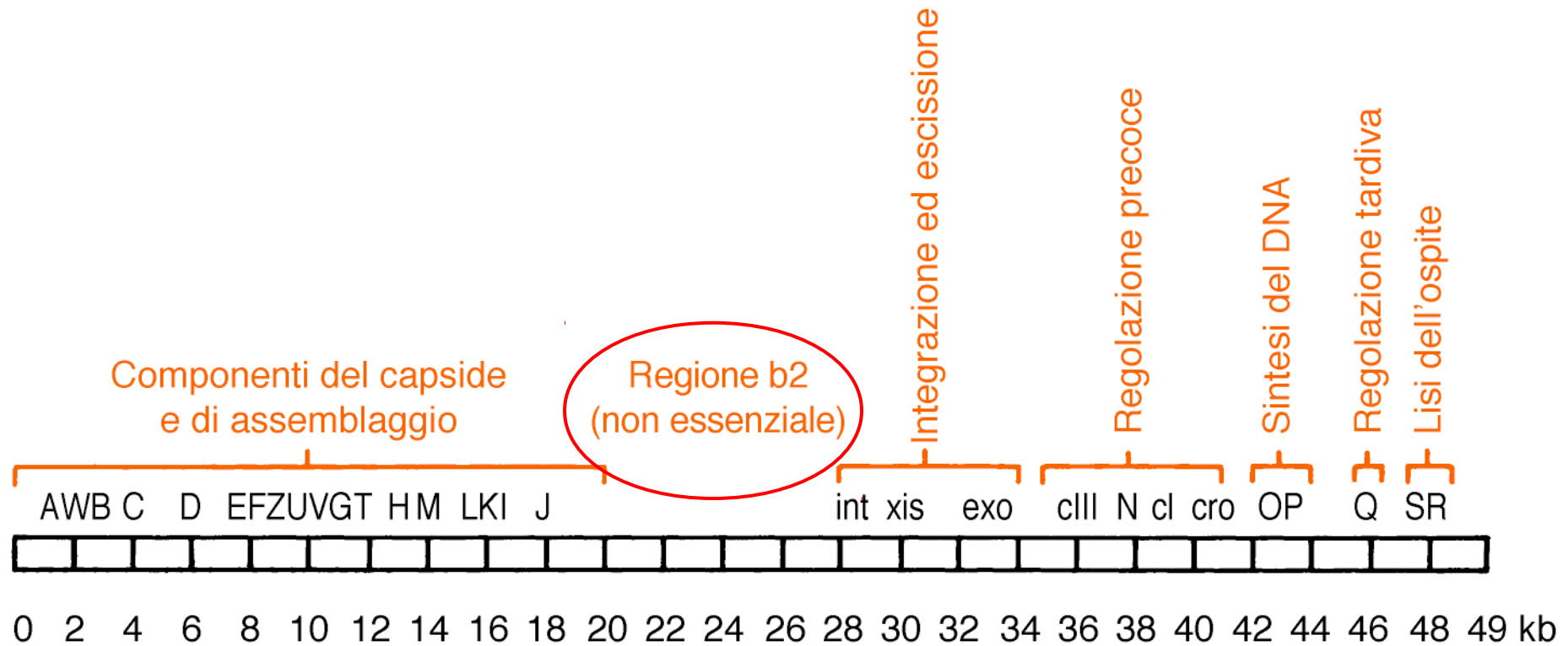
**(b) La forma circolare della molecola di DNA di  $\lambda$**



**(c) Replicazione e impacchettamento di DNA di  $\lambda$**



# Organizzazione del Genoma del Batteriofago $\lambda$



# Vettori derivati da Batteriofagi

- 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 contenete 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  $\lambda$  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 stato 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.

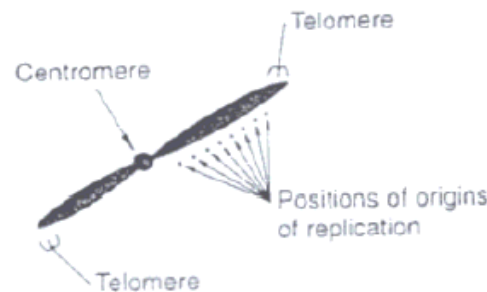
## YAC

La dimensione degli inserti genomici che sono portati in vettori tradizionali è limitata a 20-25 Kb per il fago  $\lambda$  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 sovranumerario 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 replicanti autonomamente): origini di replicazione da dove inizia la sintesi di nuovo DNA quando il cromosoma si divide.



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.

I vettori usati contengono tutte le informazioni necessarie in un plasmide che può replicarsi in *Escherichia coli*:

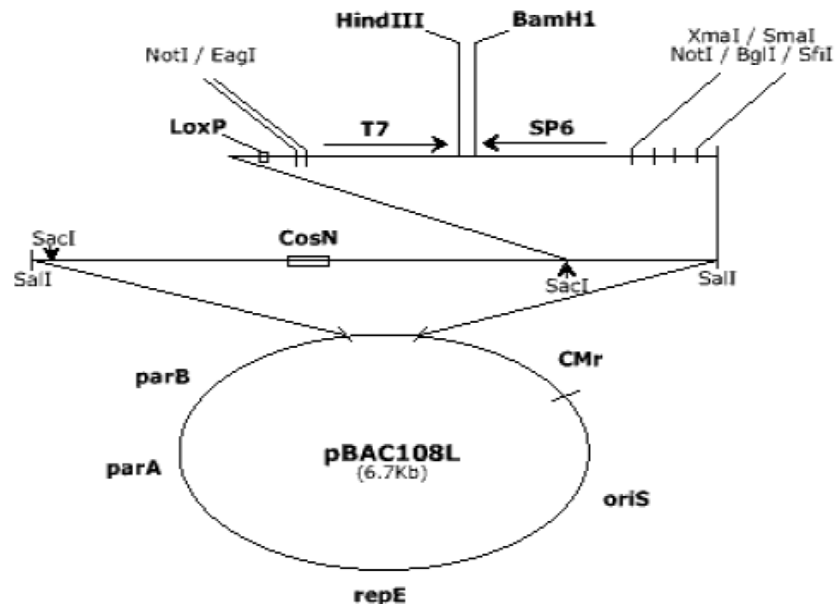
- ARS
- CEN4: sequenza di DNA della regione del centromero del cromosoma 4
- TEL: sequenze responsabili della formazione in vivo dei telomeri.
- URA3, TRP1: marcatori di selezione
- SUP4: marcatore di selezione in cui il DNA esogeno è inserito durante l'esperimento di clonaggio.

## 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.

Il vettore BAC è costituito da:

- geni *oriS* e *repE* (Mediano la replicazione unidirezionale del fattore F)
- geni *parA* e *parB* (Mantengono il numero di copie del fattore ad un basso livello (1 copia) .Un alto numero di copie potrebbe causare problemi di instabilità degli inserti per delezioni e riarrangiamenti del DNA clonato a causa di eventi di **ricombinazione omologa**)
- gene per la resistenza ad un antibiotico
- sito di clonaggio: È fiancheggiato dai promotori T7 e SP6 che generano sonde di DNA per il chromosome walking e per il sequenziamento d'inserti di DNA. *cosN* e *loxP* sono siti di taglio specifici per terminasi del batteriofago  $\lambda$  e consentono la formazione di estremità che possono essere usate, nelle mappe di restrizione, per riarrangiare i cloni. I cloni ricombinanti sono selezionati mediante colorazione bianco/blu.



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.

## LIBRERIE DI DNA GENOMICO E DI cDNA

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  $\lambda$ . 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  $\lambda$ gt 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.**

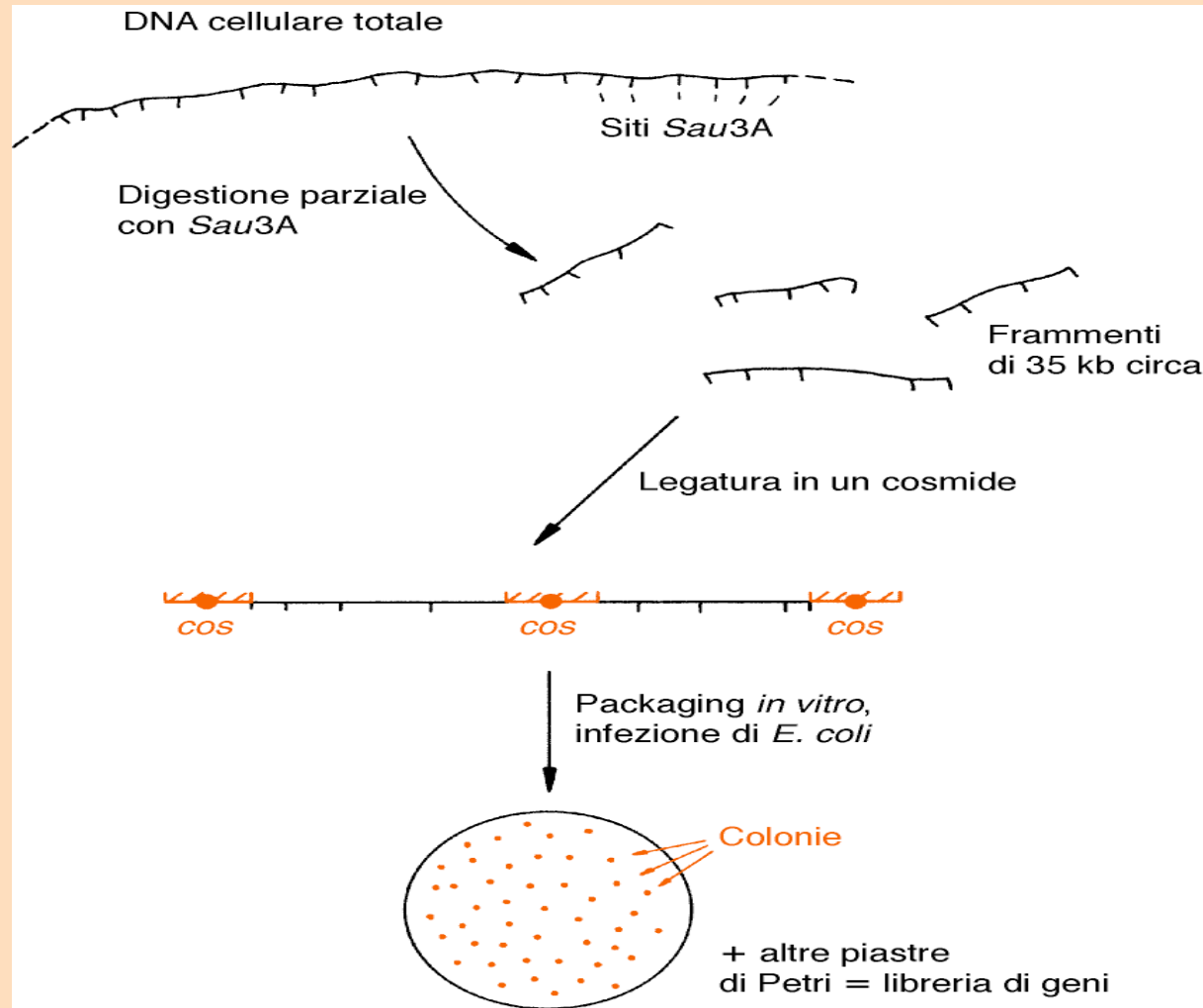
## **Libreria Genomica**

- **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.**
- **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.**

**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”.**



# Produzione di una Libreria di cDNA

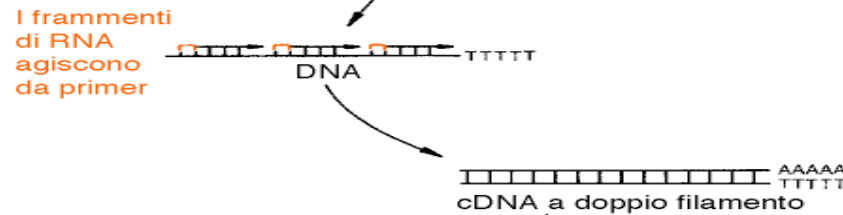
## (a) Sintesi del primo filamento



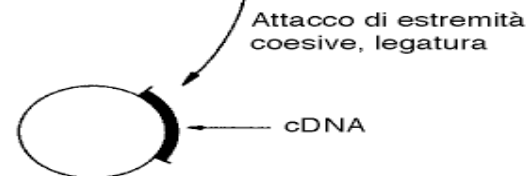
## (b) Degradazione dell'RNA



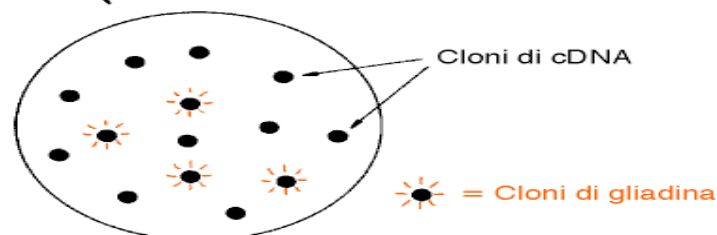
## (c) Sintesi del secondo filamento



## (d) Legatura in un vettore



## (e) Trasformazione



# **Identificazione di un Clone in una Libreria**

**Libreria → collezione di frammenti di DNA (cloni)**

- **Libreria genomica**

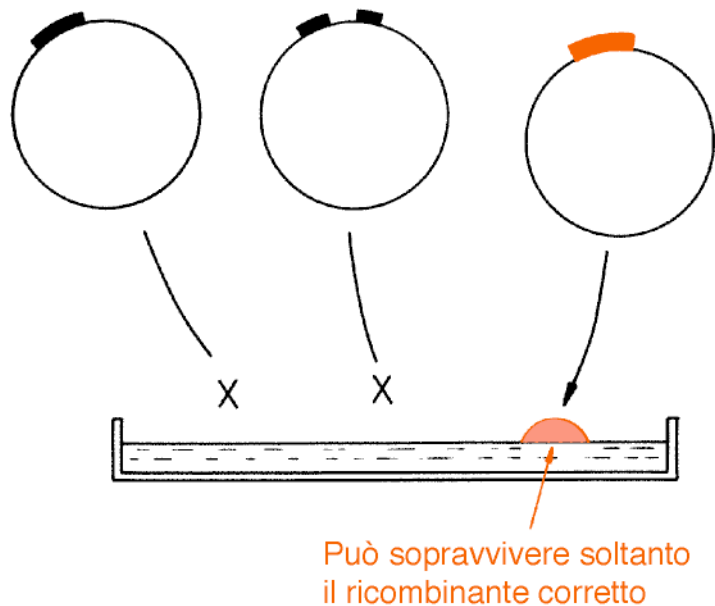
- **Libreria di cDNA**



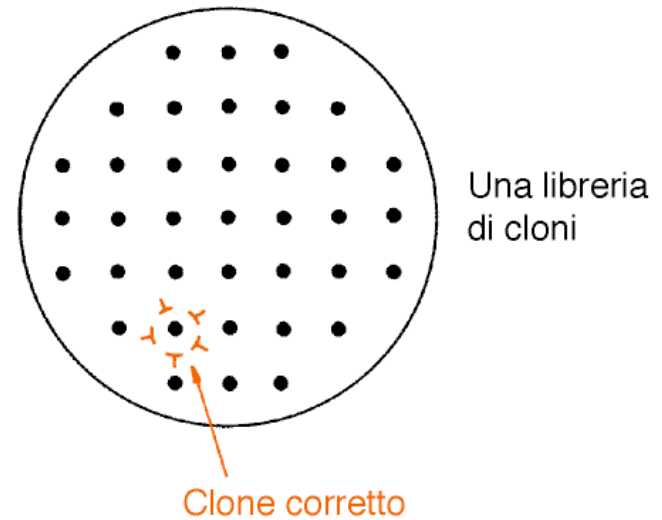
# 1. Selezione diretta

## 2. Identificazione del clone

(a) Selezione diretta

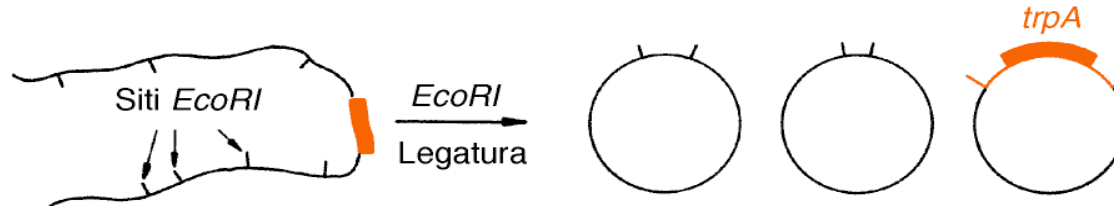


(b) Identificazione del clone

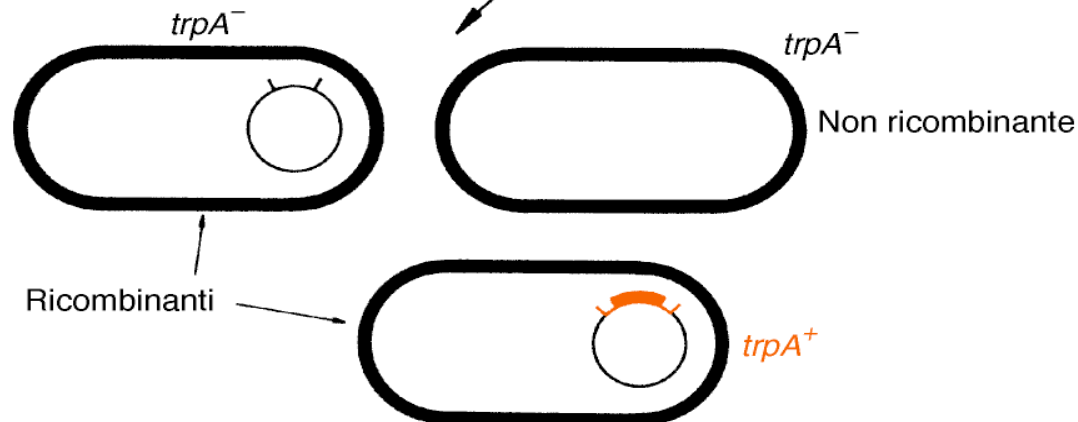


# Esempio di selezione diretta

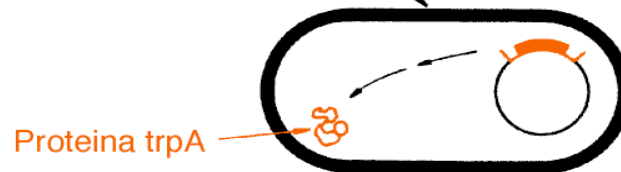
## (a) Costruzione di pBR322 ricombinante



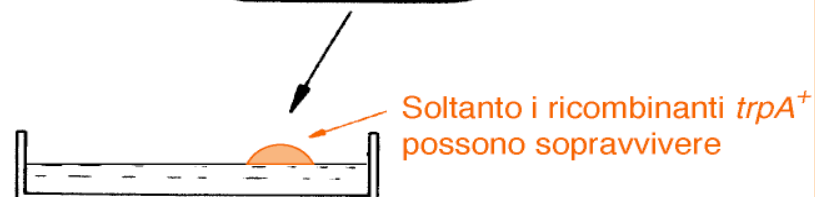
## (b) Trasformazione di *E. coli trpA*<sup>-</sup>



## (c) Il gene del plasmide è espresso

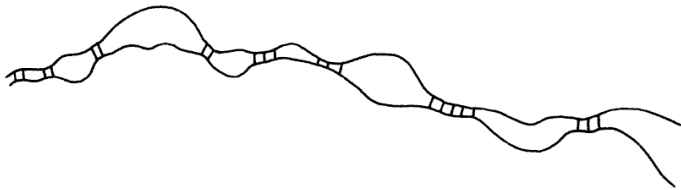


## (d) Piastratura su mezzo minimo

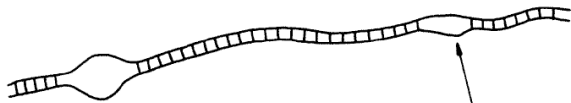


# Metodi per Identificare il Clone

(a) Un ibrido instabile

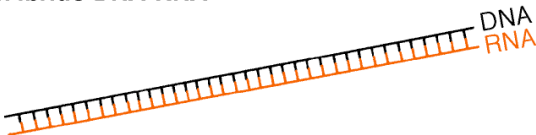


(b) Un ibrido stabile

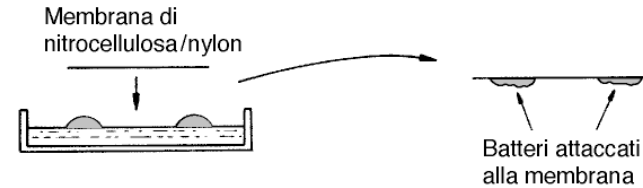


Brevi regioni non complementari non influenzano la stabilità globale

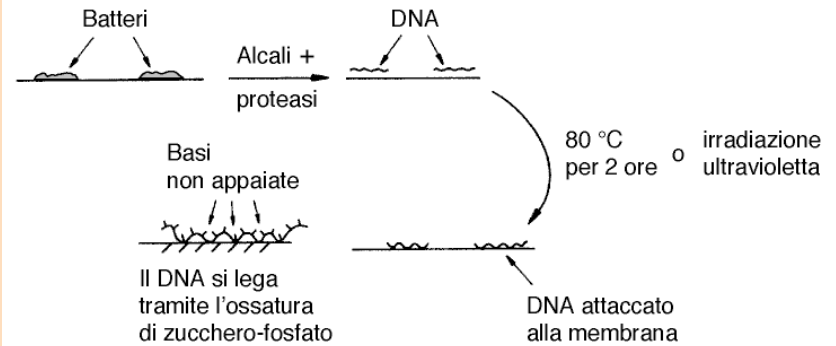
(c) Un ibrido DNA-RNA



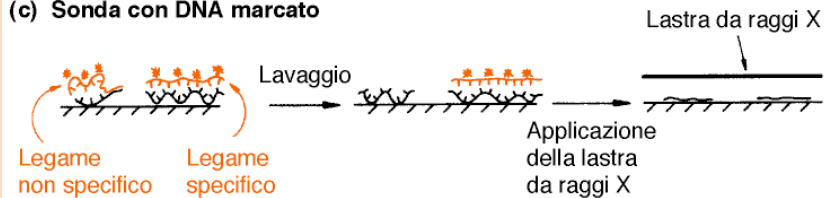
(a) Trasferimento delle colonie su nitrocellulosa o nylon



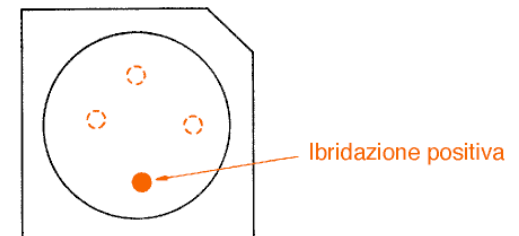
(b) Degradazione delle cellule, purificazione del DNA



(c) Sonda con DNA marcato

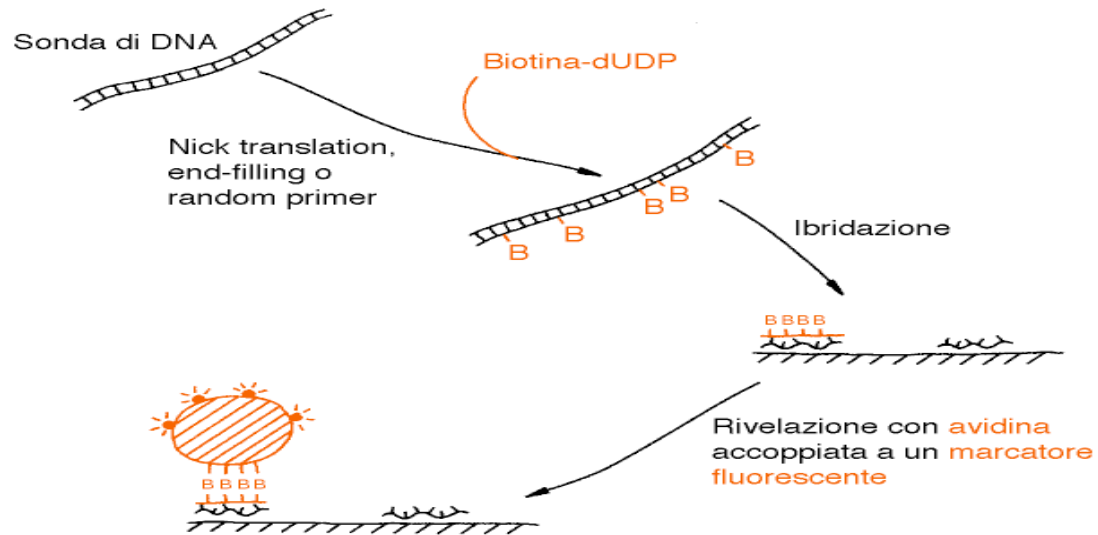


(d) L'autoradiografia che ne risulta

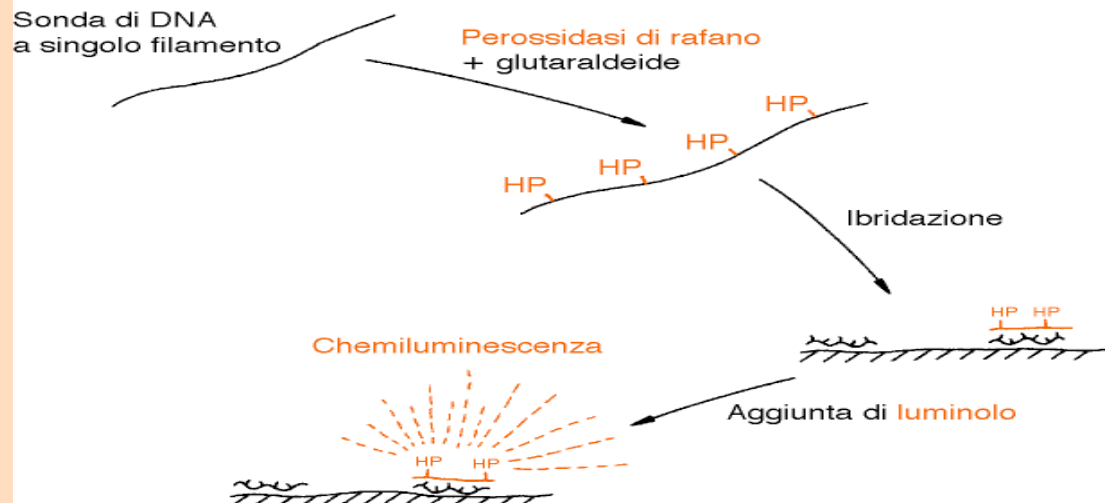


# Sonde Non Radioattive

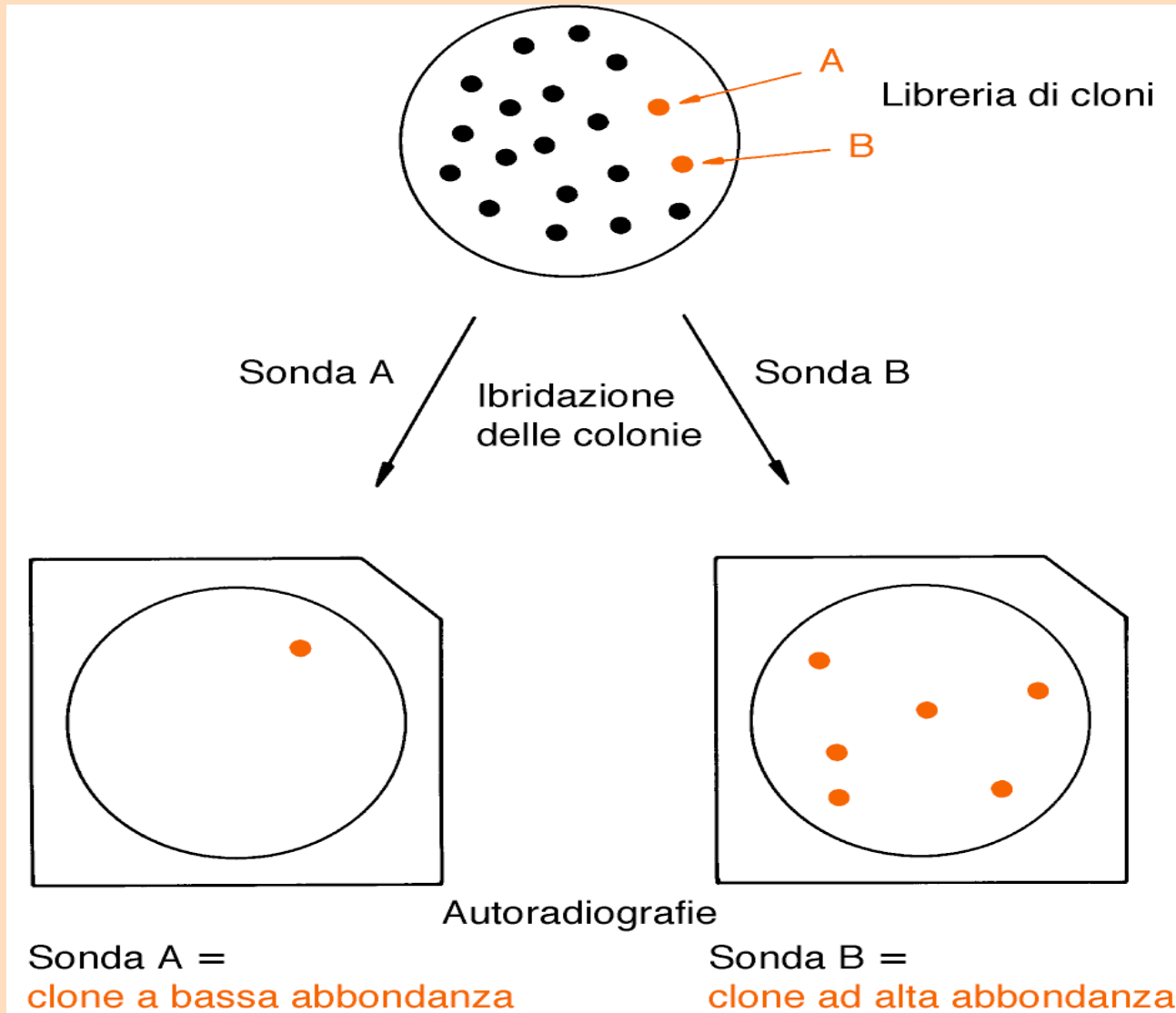
## (a) Marcatura con un nucleotide biotinilato (B)



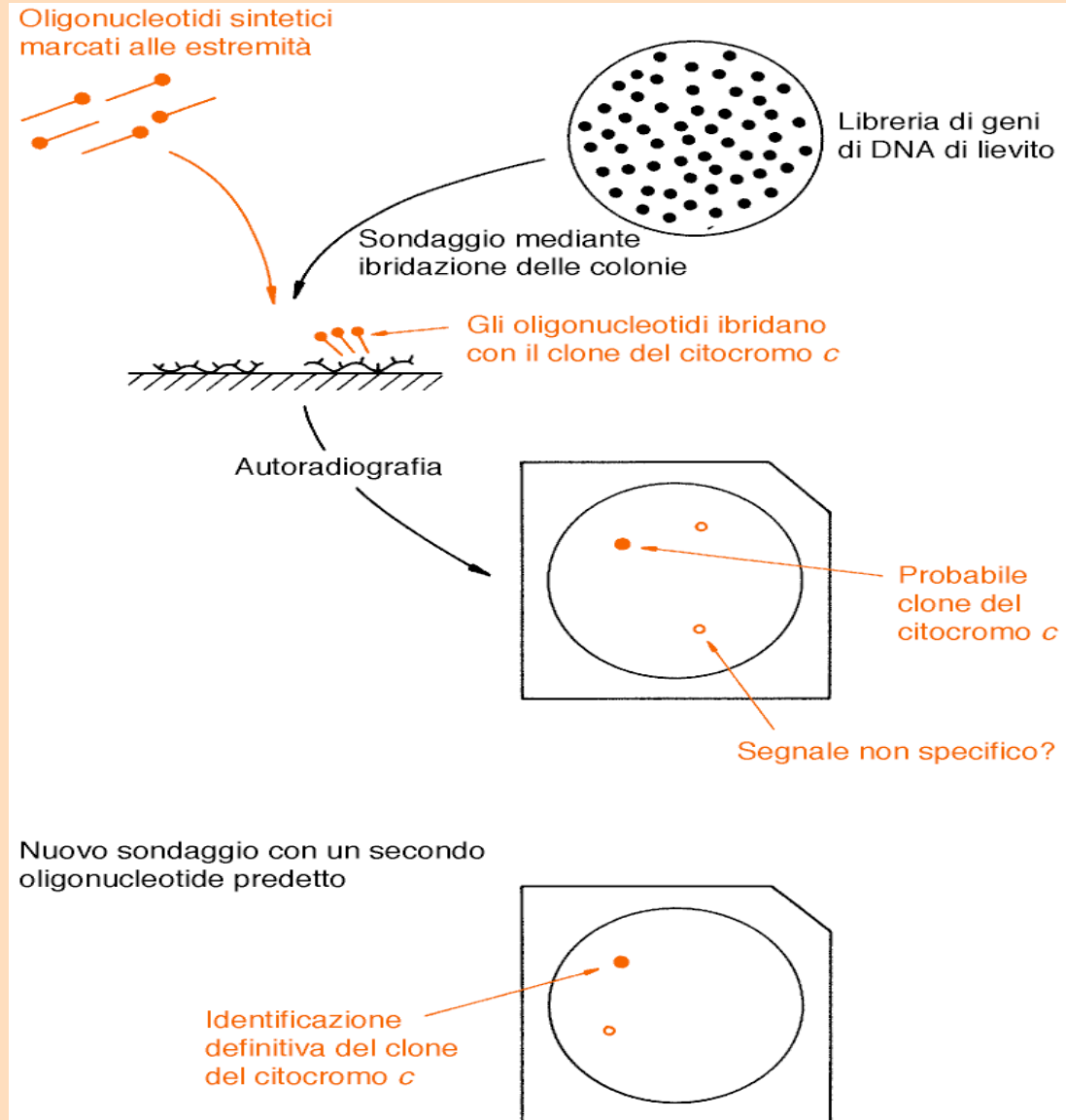
## (b) Marcatura con perossidasi di rafano (HP)



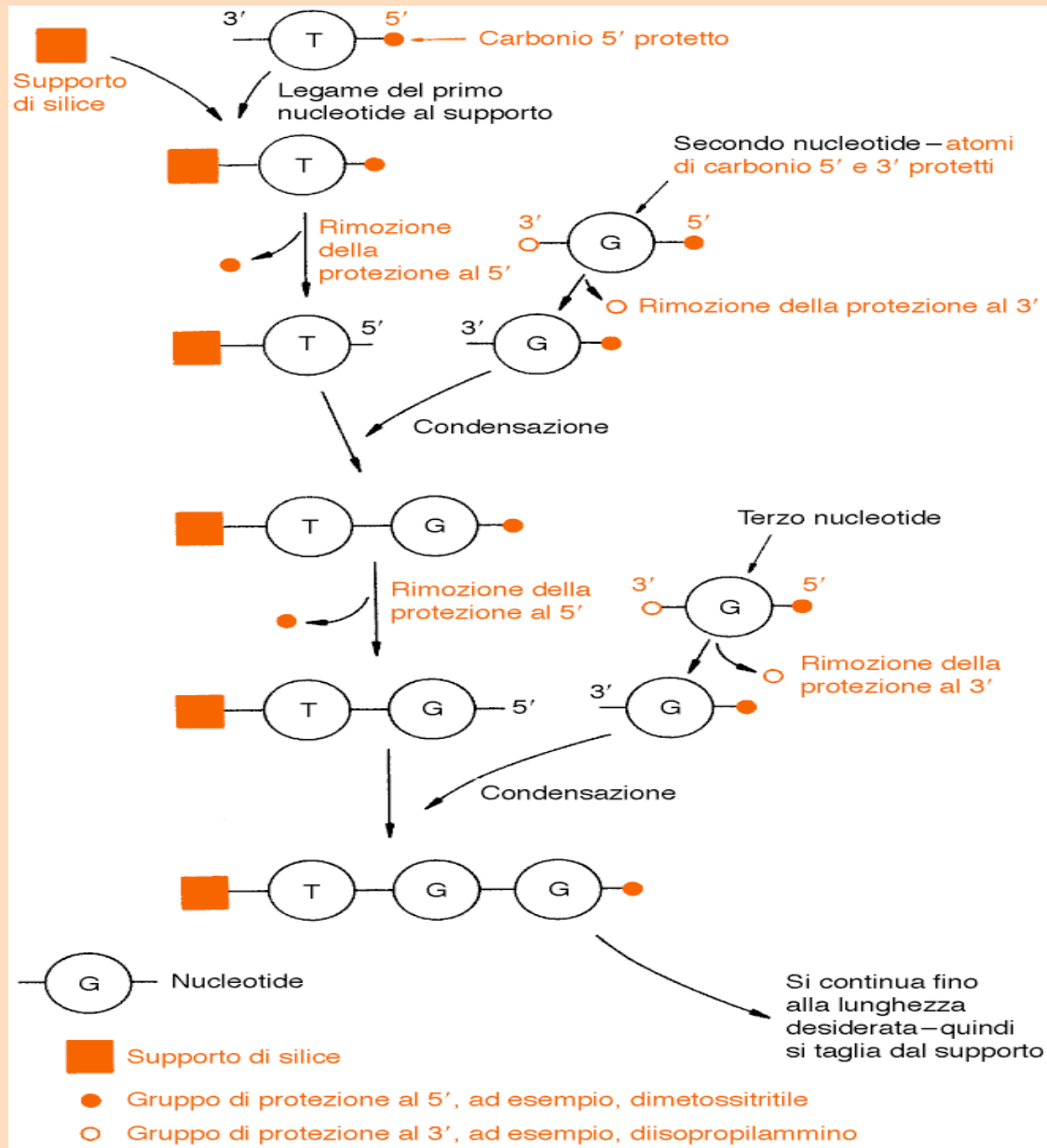
# Valutazione dell'abbondanza di Trascritto Mediante Ibridazione su un Libreria di cDNA

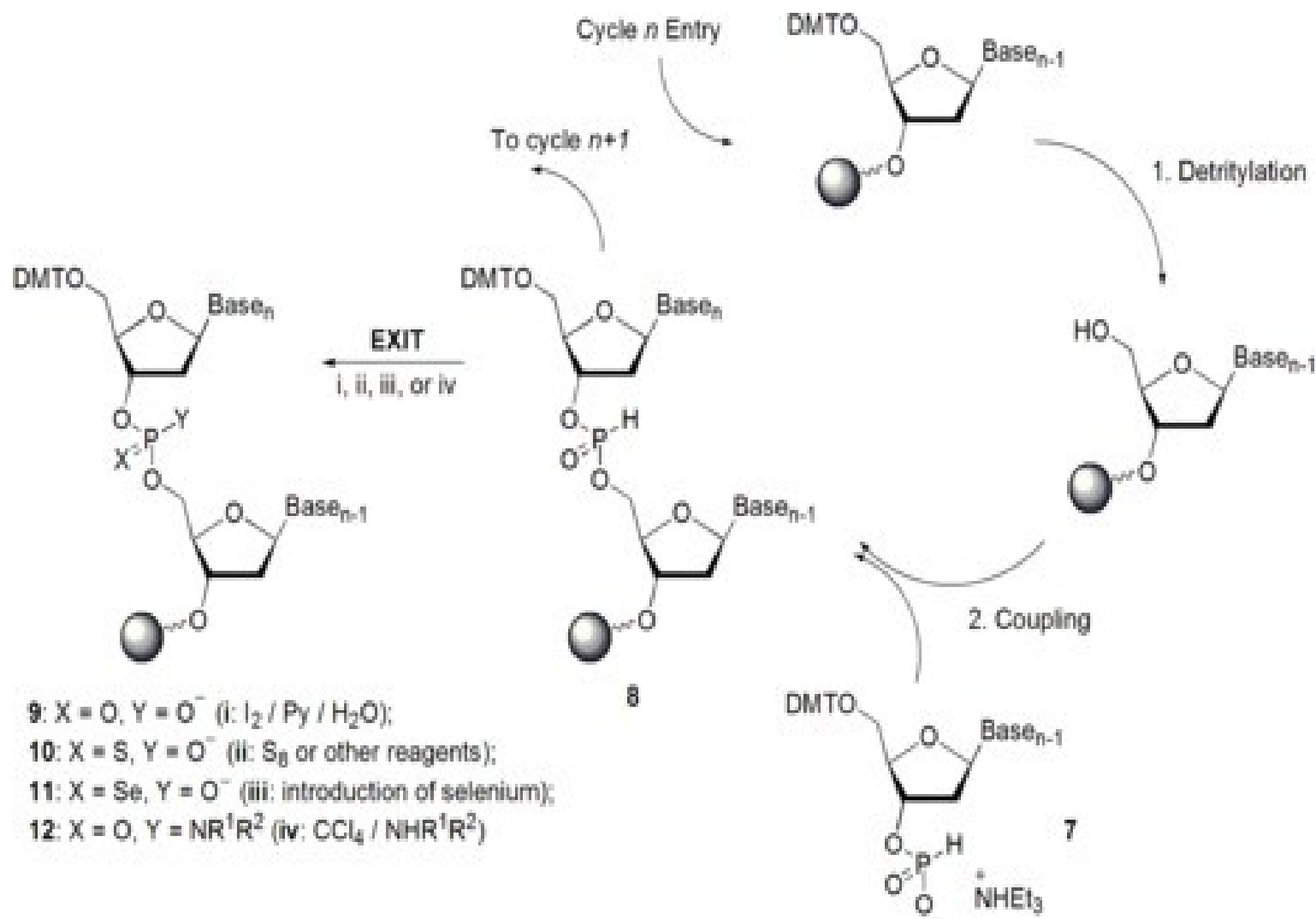


# Selezione di un Clone con Sonde di Oligonucleotidi Marcati dedotti dalla Sequenza della Proteina codificata



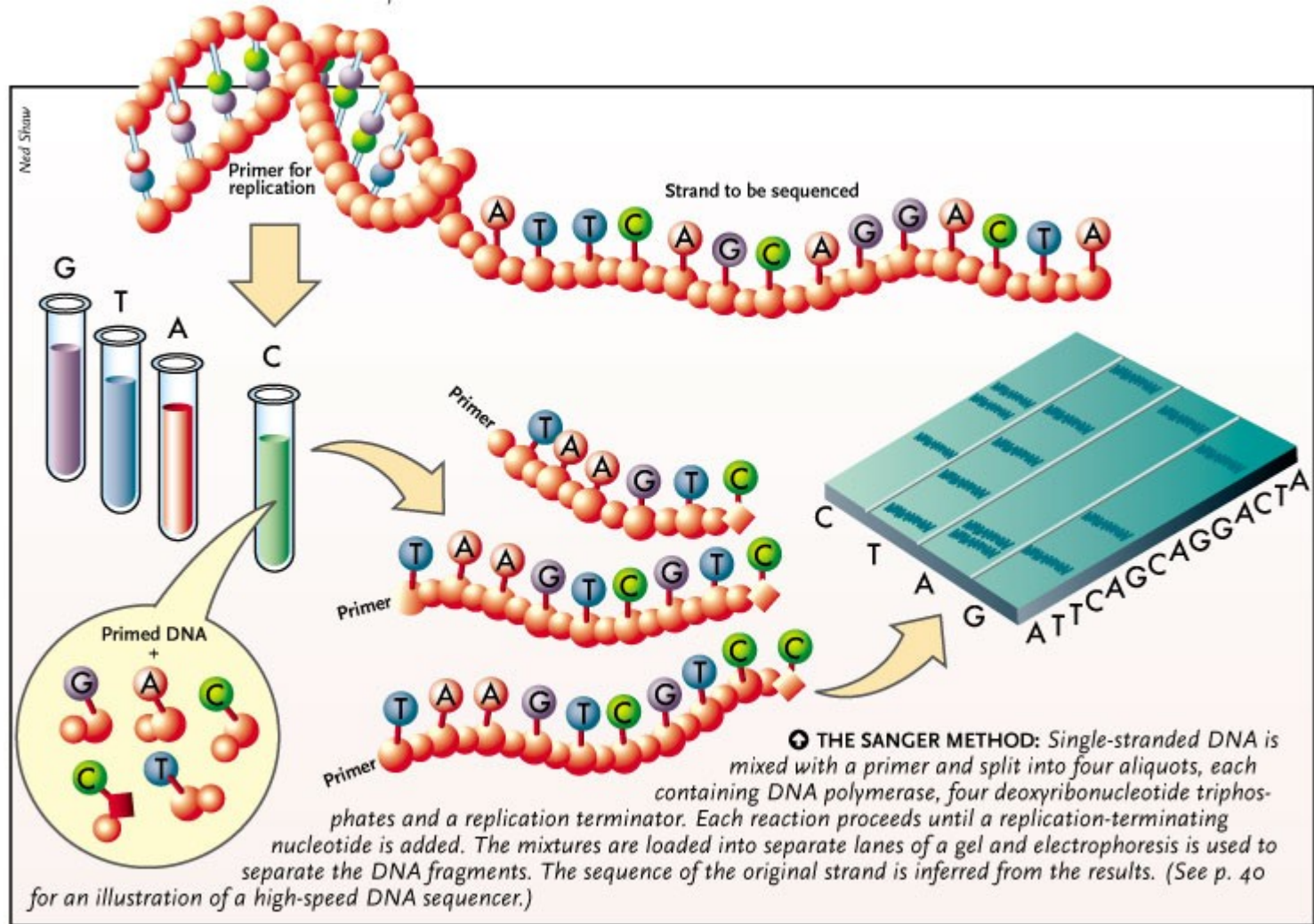
# Sintesi di Oligonucleotidi con una Sequenza Specifica



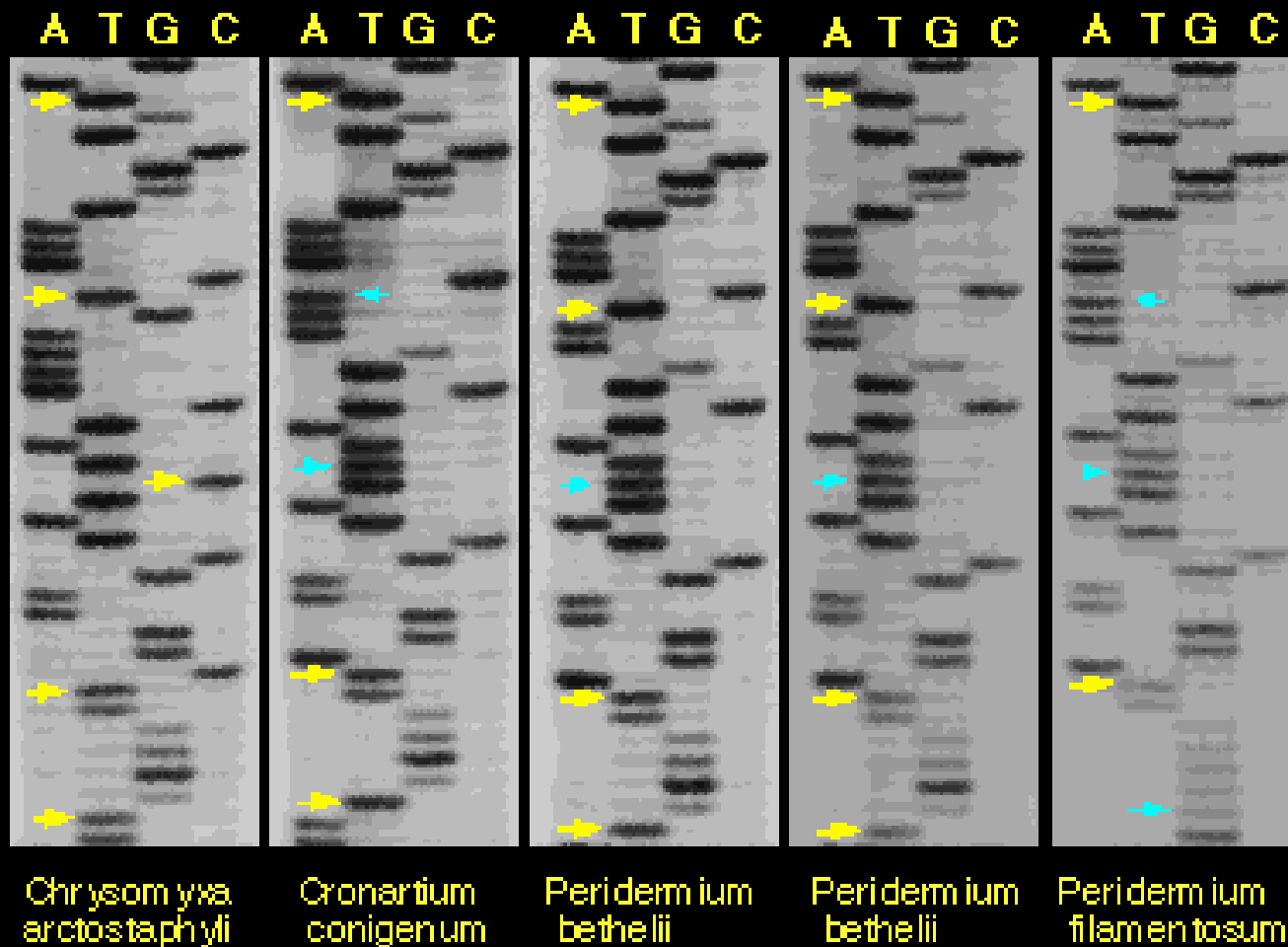




# Sequenziamento del DNA: metodo di Sanger



# <sup>35</sup>S DNA Sequencing Gel



DNA Fragments with Dye Terminators  
(Smaller fragments pass through the  
capillary first)

A A T G C A G C T T C G T

A A T G C A G C T T C G

A A T G C A G C T T C

A A T G C A G C T T

A A T G C A G C T

A A T G C A G C

A A T G C A G

A A T G C A

A A T G C

A A T G

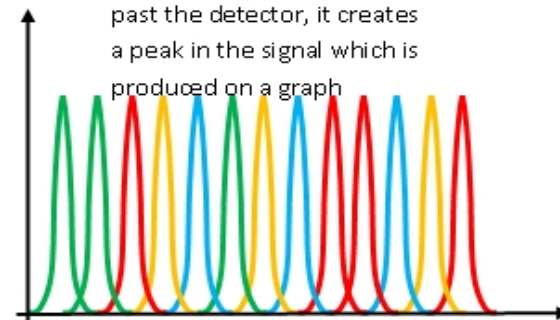
A A T

A A

A

Capillary tube

As each band of colour  
(caused by collections of  
dye terminated fragments  
of the same size) moves  
past the detector, it creates  
a peak in the signal which  
is produced on a graph



A A T G C A G C T T C G T

Sequence output

Excitation Laser

Detector

