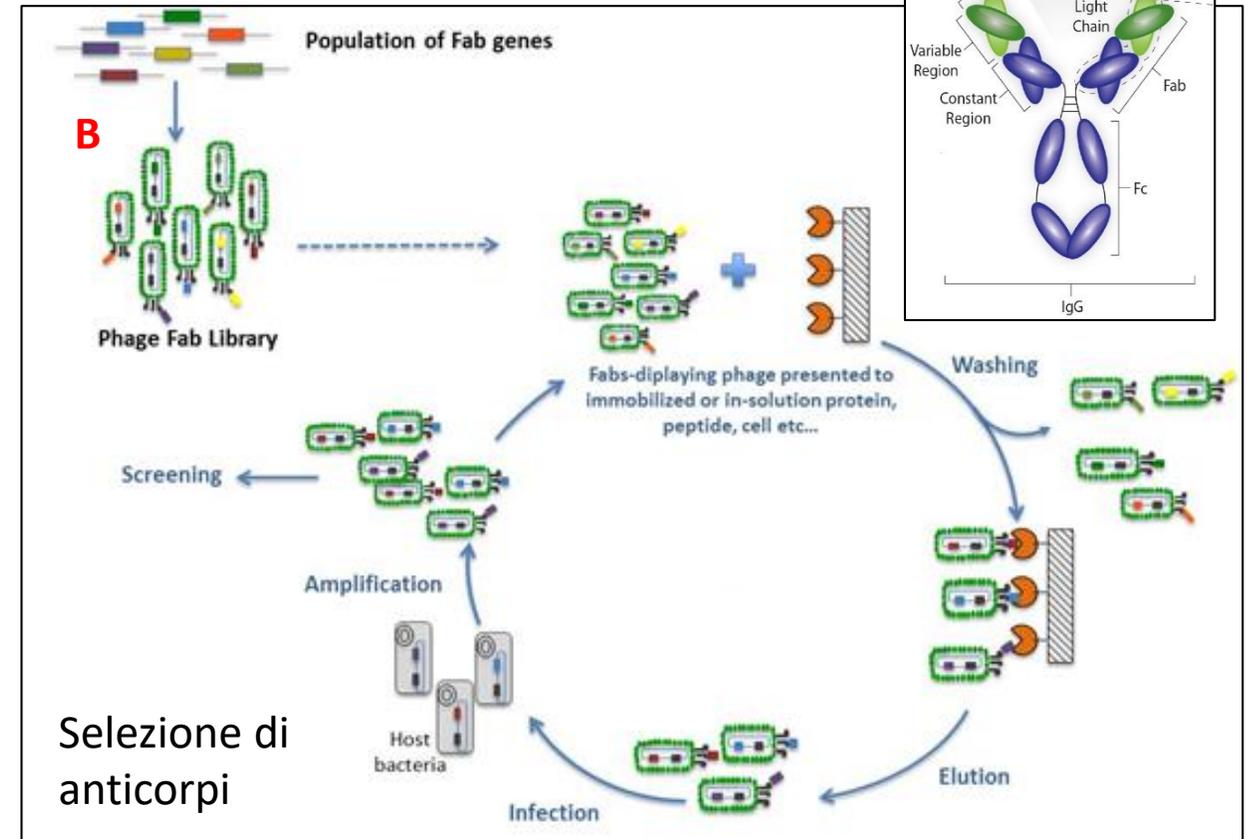
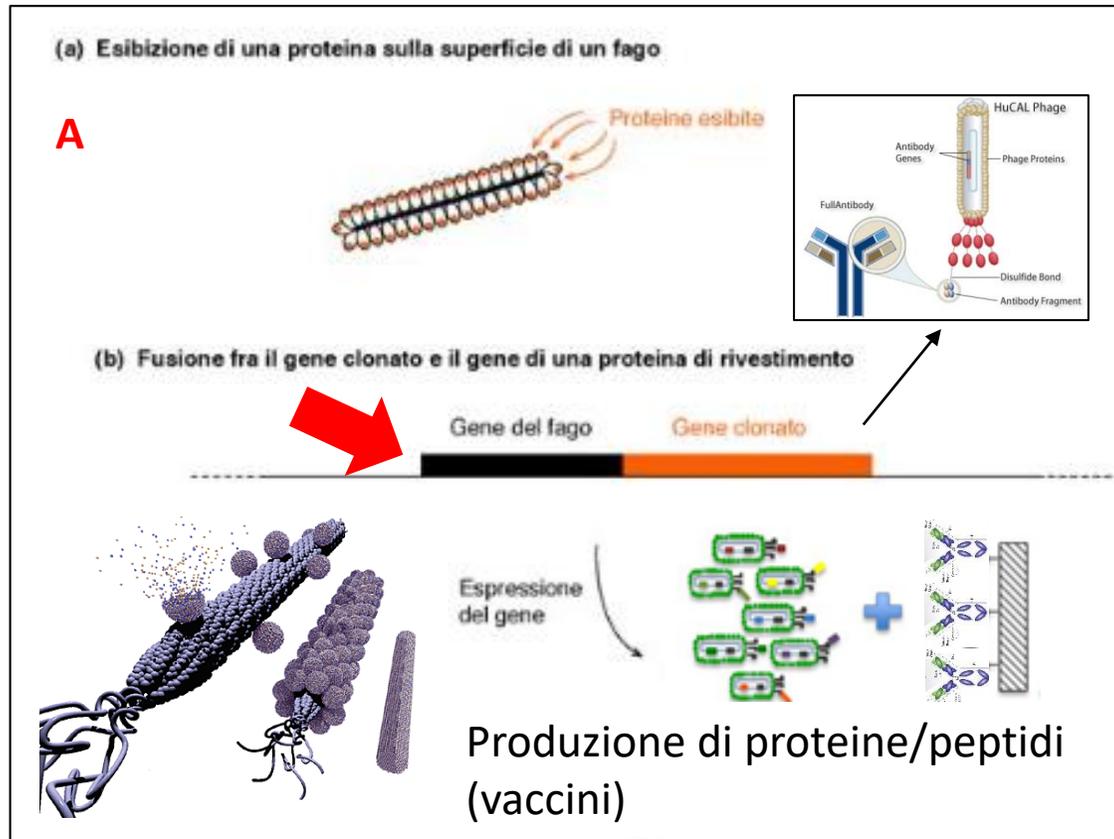


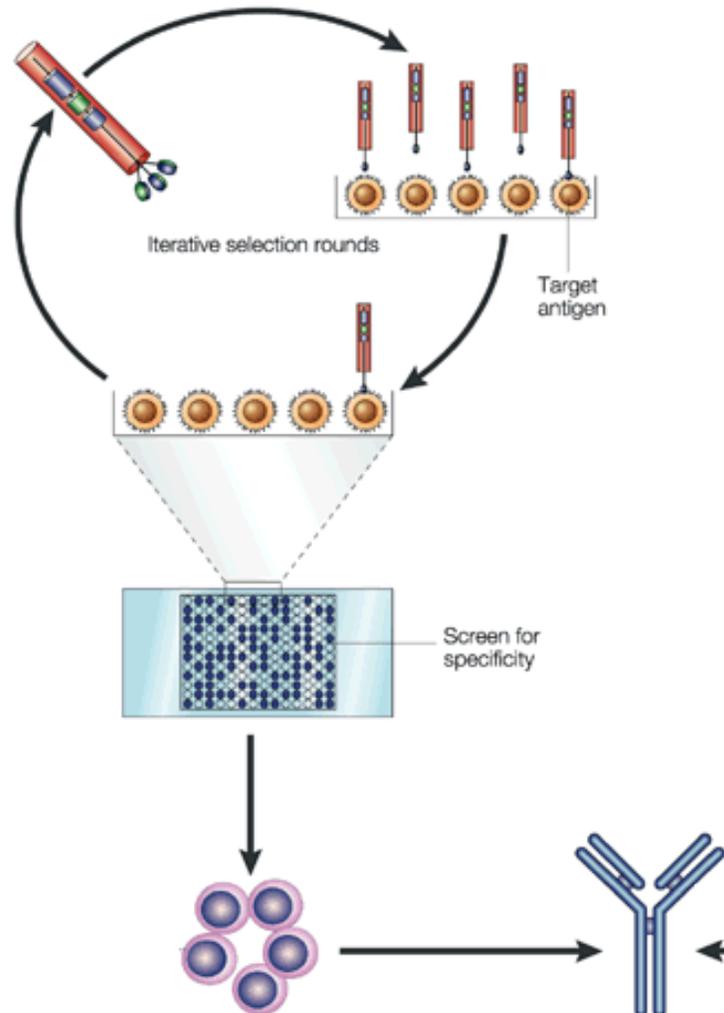
Vettori derivati dal fago λ : batteriofagi filamentosi M13

A. Phage display: esibizione della **proteina** clonata in M13 ed esposta sulla superficie del batteriofago (facile screening dei ricombinanti) mediante anticorpi specifici.

B. Fab (fragments antigen-binding) display: esibizione dei prodotti di geni per Fab di **anticorpi**, per selezionare anticorpi diretti contro antigeni/epitopi specifici



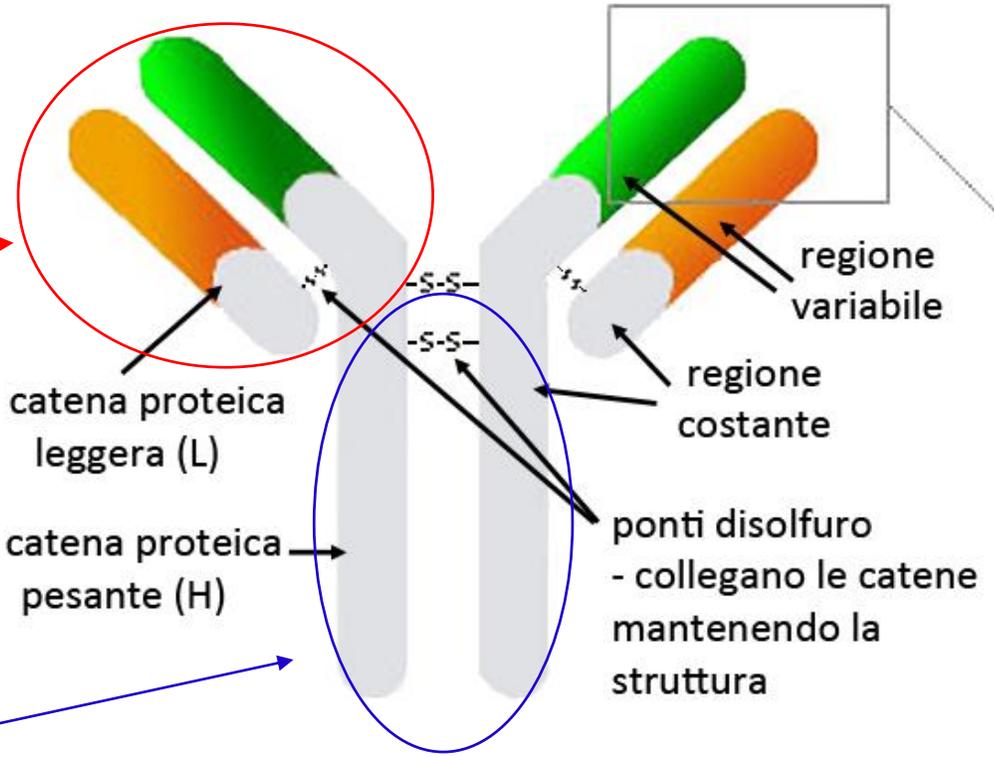
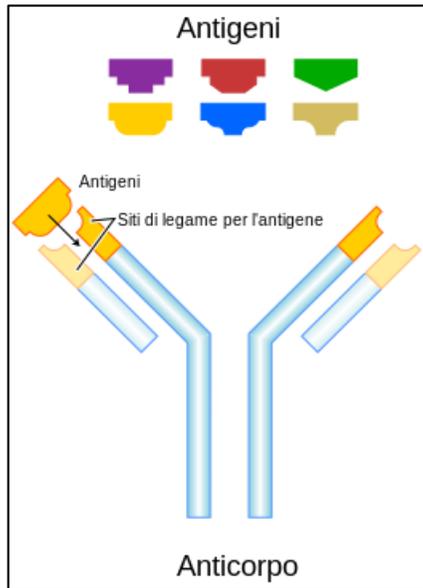
Phage Display: per selezionare cloni cellulari da paziente (per immunoterapia)



Anticorpo

Fab:
Fragment
Antigen
Binding

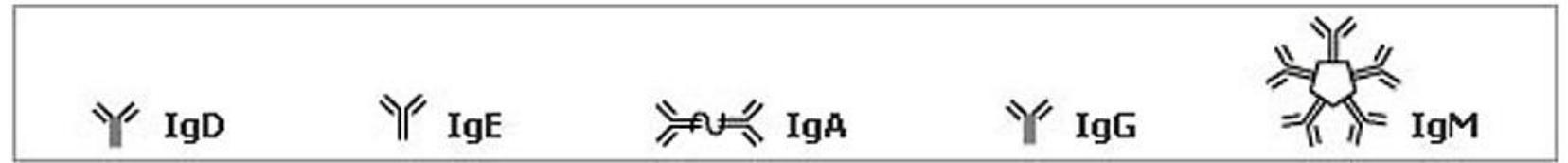
Fc:
Frammento
cristallizzabile



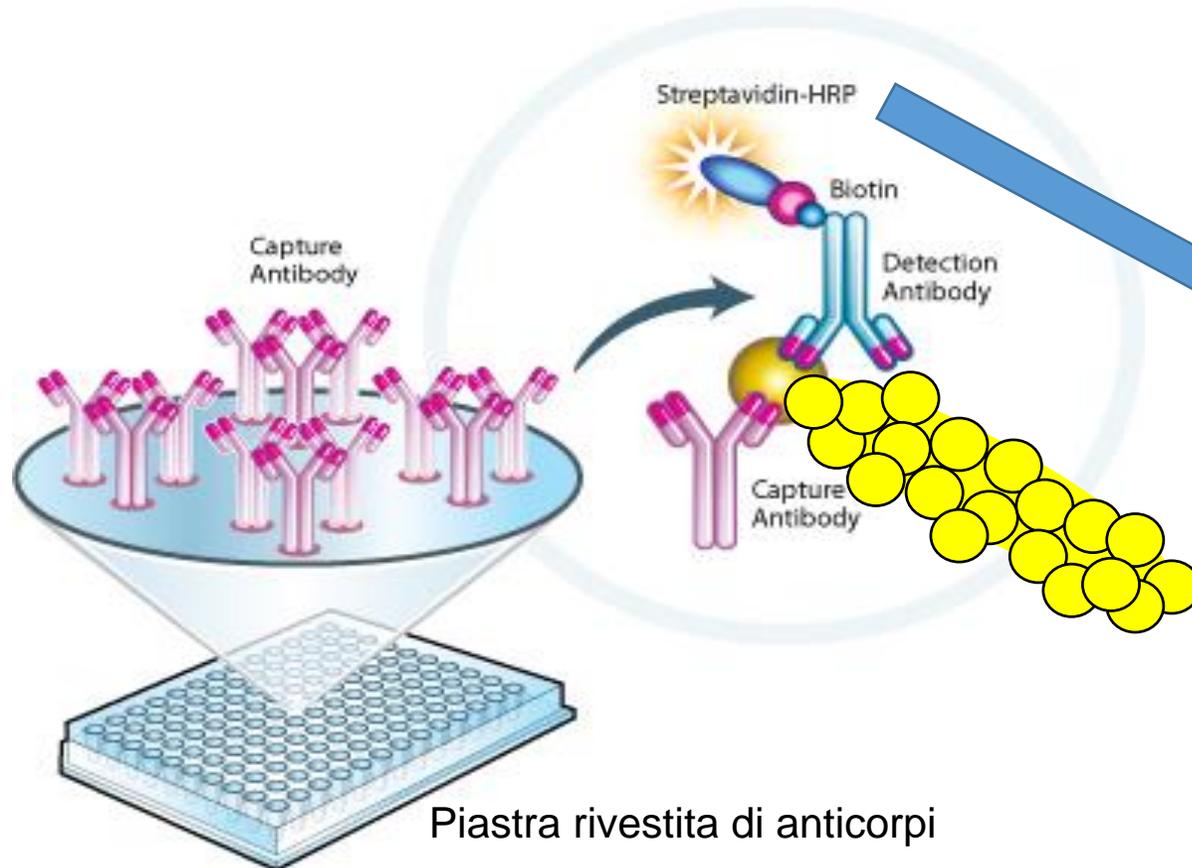
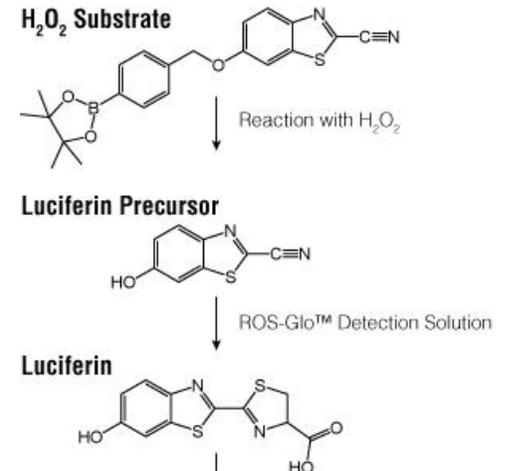
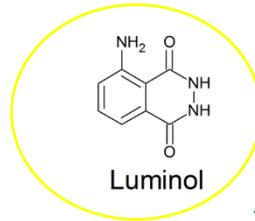
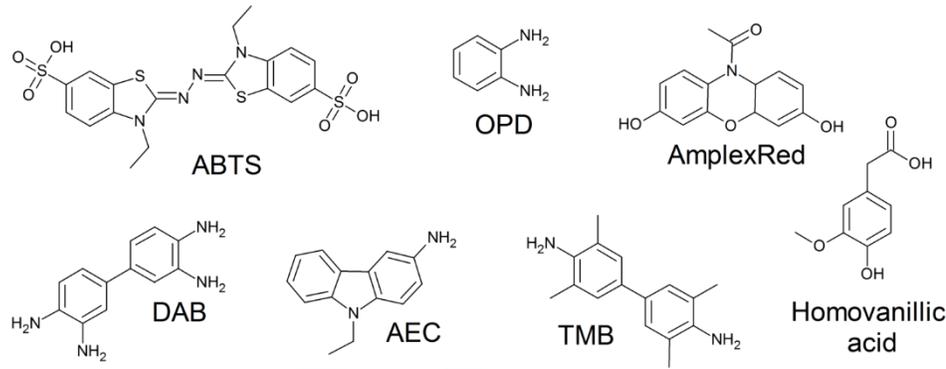
Dettaglio della regione variabile



struttura degli anticorpi



Screening di librerie con anticorpi



substrate

peroxidase

HRP
(Horseradish peroxidase)

Streptavidina

Biotina

Vantaggi dei vettori a singolo filamento

- Clonaggio non limitato dall'impaccamento, **aumento delle dimensioni dell'inserito** rispetto ai batteriofagi
- Nella forma replicativa a doppio filamento può essere manipolato come un plasmide
- Il vettore nella sua forma a singolo filamento può essere usato nel clonaggio per:
 - ❑ **Sequenziamento** diretto sul singolo filamento
 - ❑ **Phage Display**
 - ❑ Produzione di DNA mutato: **mutagenesi sito-specifica** mediante oligonucleotidi
 - ❑ Produzione di **sonde a singola elica per l'ibridazione molecolare**

Applicazioni della mutagenesi sito-specifica

analisi dei domini funzionali di una proteina

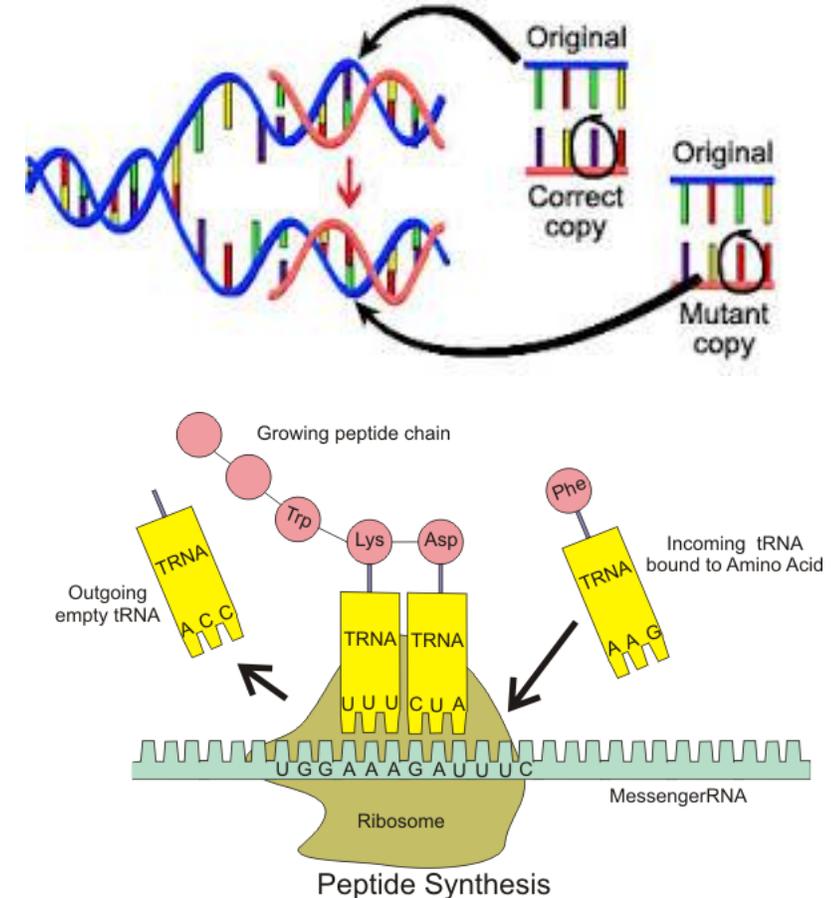
Mutagenesi: Insieme dei processi chimico-fisici che portano a una **mutazione**. In senso più stretto, la tecnica con cui si altera la sequenza di basi del DNA per analizzarne gli effetti sulla funzione del gene o del DNA stesso.

Questi processi determinano l'insorgenza di una mutazione casuale, **ma può essere necessario indurre una mutazione in un sito specifico, in modo predeterminato, per applicazioni come**

1. la modifica di un aminoacido:

- ❑ **Analisi dei domini funzionali di una proteina:** sostituire residui aminoacidici ed analizzare le variazioni funzionali (sito catalitico, ruolo della fosforilazione aminoacidica)
- ❑ **L'uso dei codoni può influenzare o impedire l'espressione genica di una proteina ricombinante.** In alcune circostanze, come quando si vuole esprimere delle proteine estranee all'ospite (soprattutto in *E. coli*) può essere necessario **modificare il cDNA clonato**, sostituendo le sequenze corrispondenti a quei codoni per i tRNA rari con quelli per i tRNA più frequenti nell'ospite, mantenendo però le caratteristiche del prodotto proteico finale.

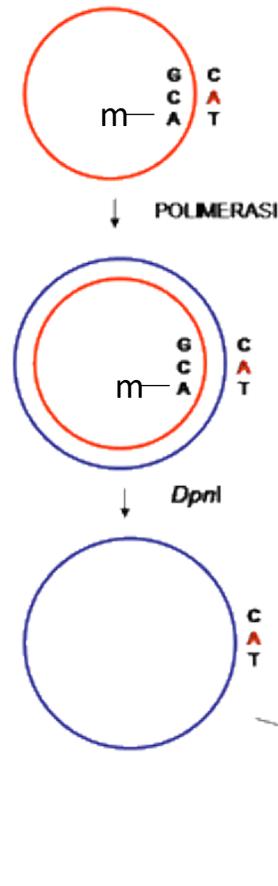
2. Necessario ricostruire l'intero gene: per assembly PCR o sintesi diretta



Mutagenesi sito-specifica: in M13 (di un frammento clonato nel fago M13)

- Viene utilizzato un DNA vettore a singolo filamento come il fago M13 contenente il gene ricombinante (gene da modificare) e trasfettato in un particolare ceppo di *E. coli* (dam+). Il gene *dam* codifica per una metilasi che trasferisce un gruppo metilico dall'S-adenosilmetionina all'N6 di residui di adenina nella sequenza GATC, così che il DNA M13 ricombinante risulterà metilato. Purificazione del ssDNA.
- La mutazione può essere inserita *in vitro* direttamente nel vettore M13 metilato e contenente il gene clonato da modificare. Il primer è disegnato in modo da riconoscere la sequenza da mutagenizzare e contiene la base mutata, ma si appaia al DNA nel vettore anche se non perfettamente complementare.
- Fase di polimerizzazione con estensione dal primer mutato usando una polimerasi ad alta fedeltà per la creazione del nuovo filamento, contenere la mutazione
- Digestione con l'enzima DpnI (metilsensibile, taglia solo il filamento metilato) solo il filamento wild type viene digerito, mentre il mutato rimarrà integro non essendo metilato (perché prodotto *in vitro*)
- Trasformazione di cellule competenti col nuovo ssDNA M13 ricombinante-mutagenizzato esprime la proteina come proteina di fusione per lo studio della sua interazione con altre molecole

E. coli
dam+

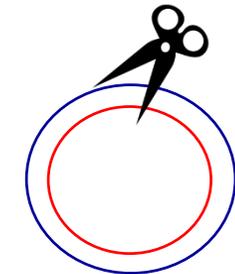
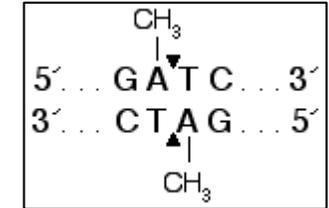


Step 1 – Vengono disegnati uno o più oligo con la sequenza/le complementari alle basi da cambiare

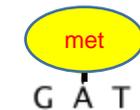
Step 2 – Viene aggiunto l'oligo e polimerizzato il nuovo filamento mutagenizzato

Step 3 – Il vecchio filamento metilato viene digerito con DpnI

Step 4 – Il plasmide single strand con la base mutagenizzata viene trasformato in *E. Coli* e replicato



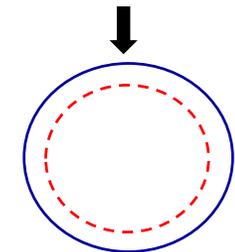
digestione con DpnI



Wild type

CTAG

Hemimethylated DNA



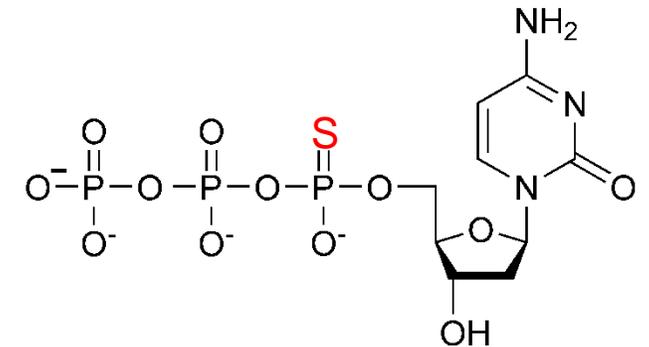
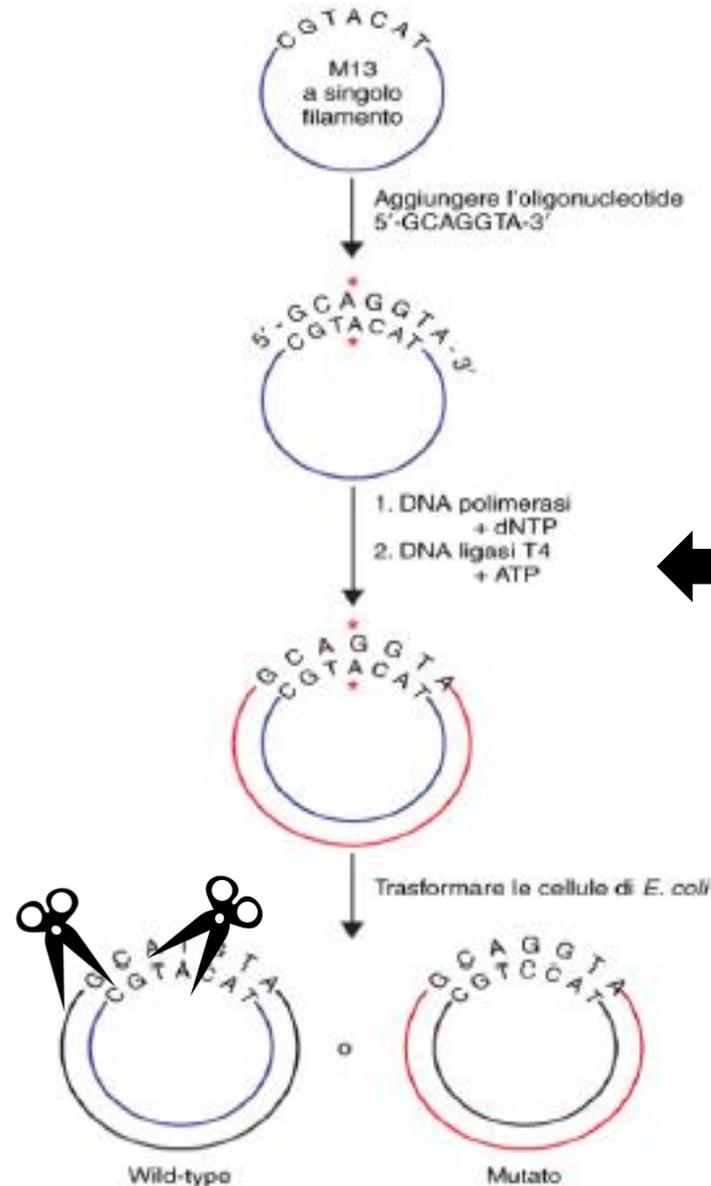
mutato

Mutagenesi sito-specifica: metodi di selezione dei filamenti

1. Polimerizzazione in vitro: un **oligonucleotide mutato** è usato come **innesco** per la **polimerizzazione** in presenza di una miscela dei seguenti dNTPs: dATP, dTTP, dGTP e un **nucleotide modificato** contenente fosforo-zolfo **dCTP α S**

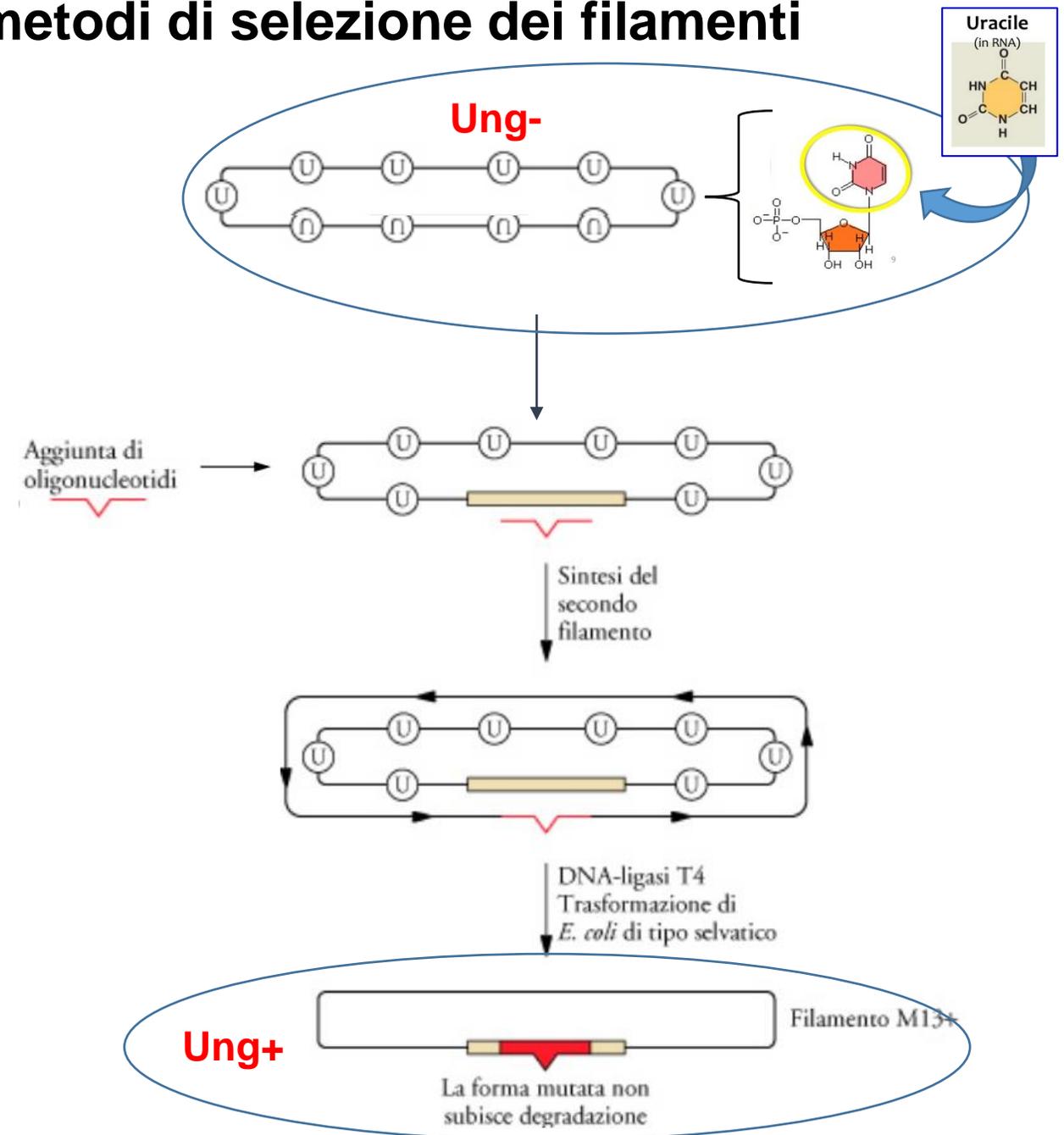
2. **Incorporazione del fosforotioato** nel nuovo **filamento mutagenizzato di DNA**

3. **Digestione con una nucleasi**, che degraderà solo il **filamento wild type**

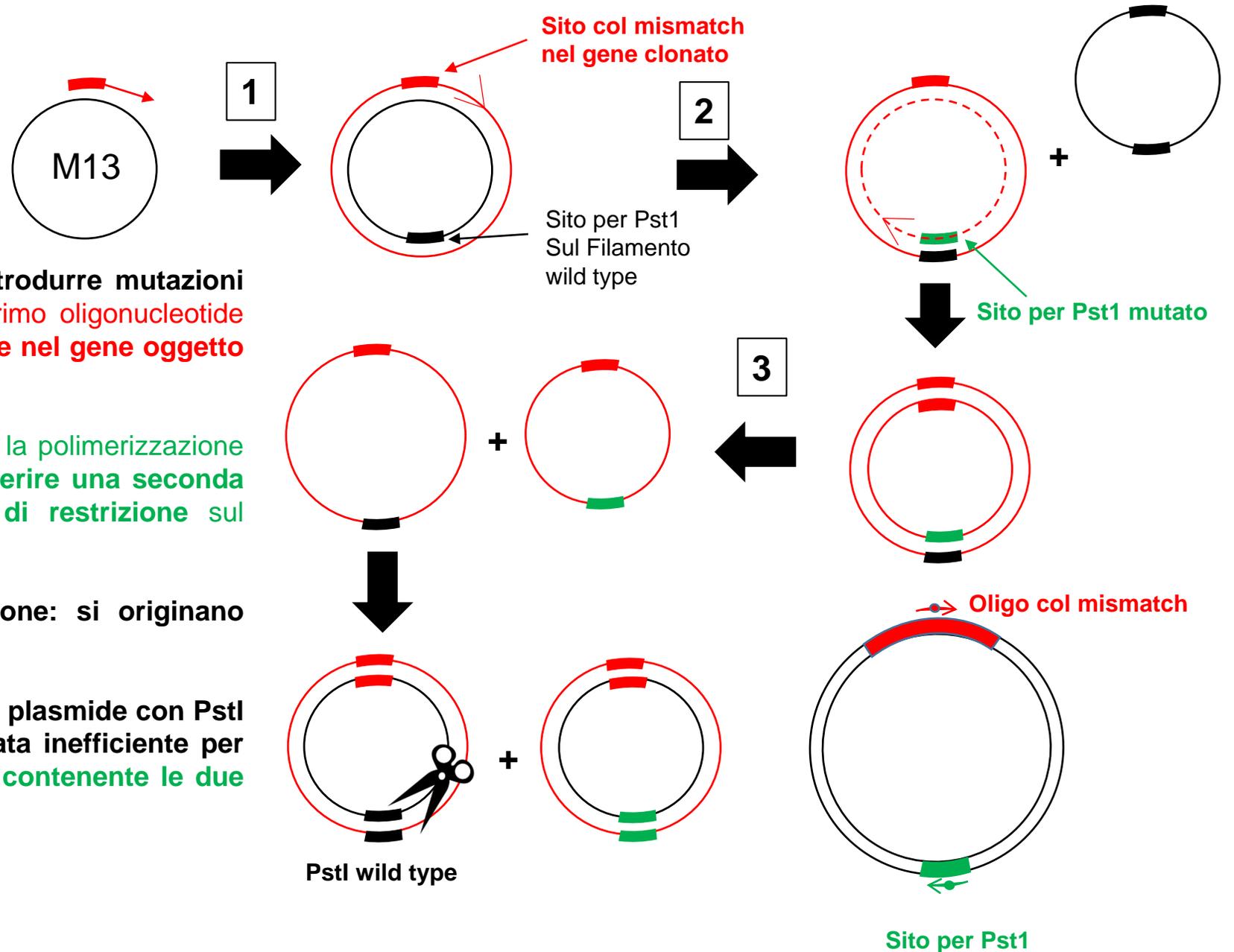


Mutagenesi sito-specifica: metodi di selezione dei filamenti

- In vivo:** replicazione del M13 ssDNA contenente il gene d'interesse da mutagenizzare in batteri *E. coli* mancanti dell'Uracil glicolsilasi (**Ung-**), mancanti dell'enzima che degrada i templati di DNA contenenti uracile. In presenza di Uracile nel terreno di coltura questo sarà incorporato nel filamento wild type.
- Isolamento e purificazione del filamento ssDNA contenente Uracile: **Mutagenesi in vitro con** l'oligonucleotide mutato.
- Polimerizzazione in assenza di Uracile per creare il nuovo filamento complementare che non conterrà Uracile.**
- Trasformazione in batteri *E. coli* con l'enzima Uracil glicolsilasi (**Ung+**), che degrada i templati contenenti Uracile, lasciando integro solo il filamento mutato**



Mutagenesi sito-specifica con due primers mutati



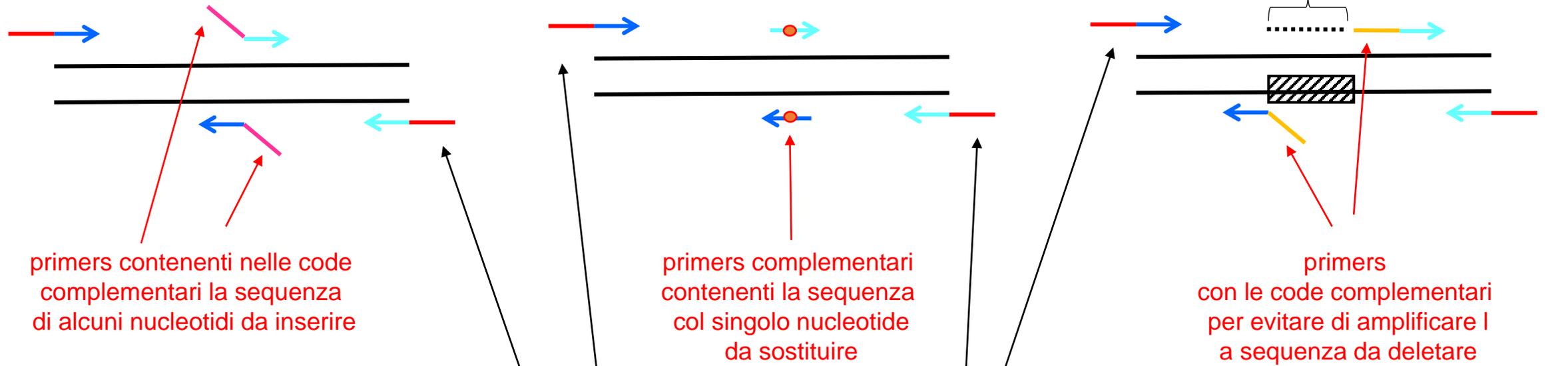
1. Con questa metodica si possono introdurre mutazioni in due posizioni specifiche: con il primo oligonucleotide viene inserita la mutazione di una base nel gene oggetto di studio,
2. mentre dopo la denaturazione, avviene la polimerizzazione col secondo oligonucleotide, per inserire una seconda mutazione nel sito di un enzima di restrizione sul plasmide wild type
3. Denaturazione e altra polimerizzazione: si originano due tipologie di plasmidi
4. Digestione con PstI per linearizzare il plasmide con PstI wild type parentale, (forma linearizzata inefficiente per la trasformazione), mentre il vettore contenente le due mutazioni rimane integro
5. trasformazione

Mutagenesi sito-specifica: applicazione della tecnica di PCR usando due oligonucleotidi mutati

inserzione

sostituzione

delezione



primers esterni con coda per il sito di restrizione del clonaggio

