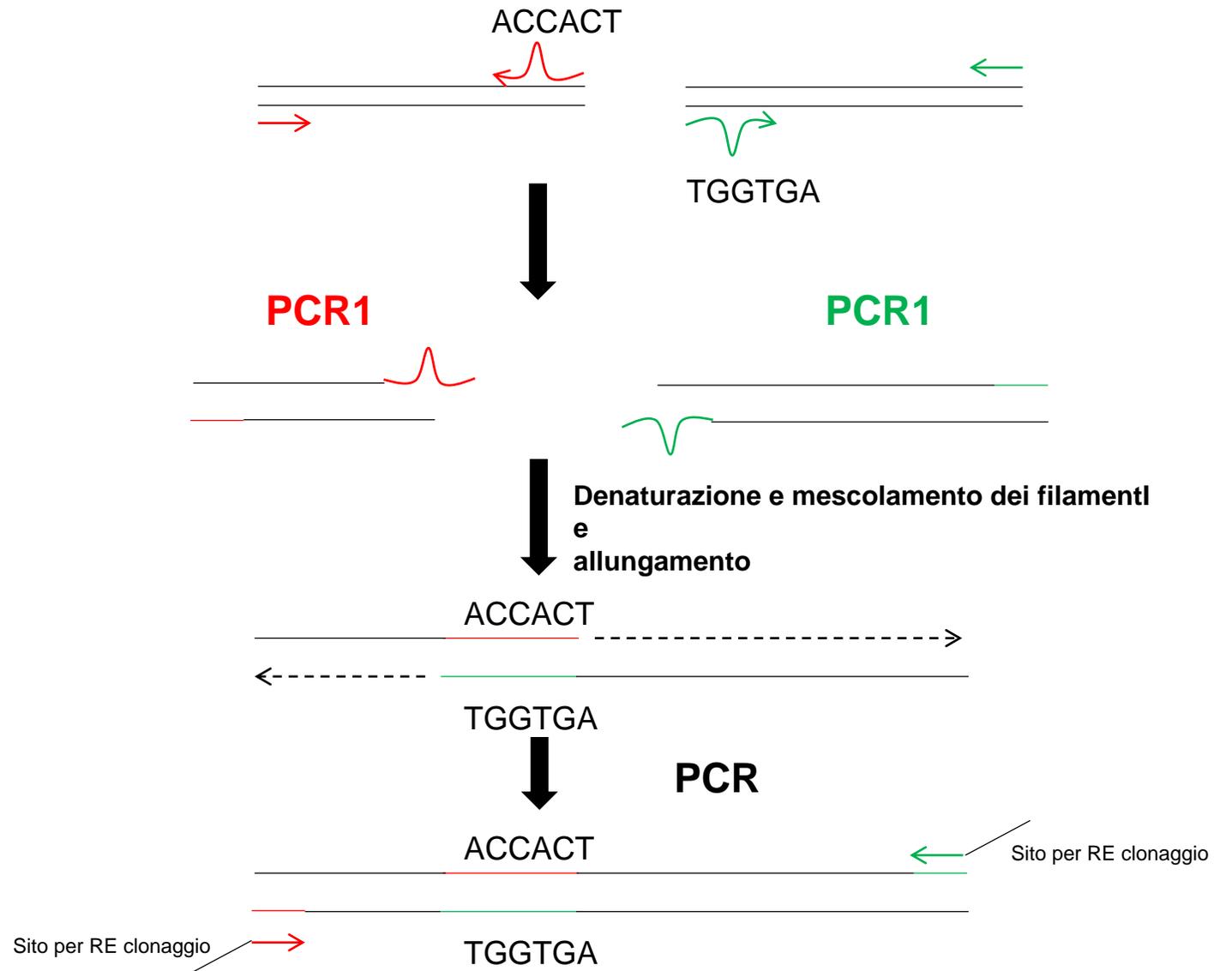


Mutagenesi sito-specifica

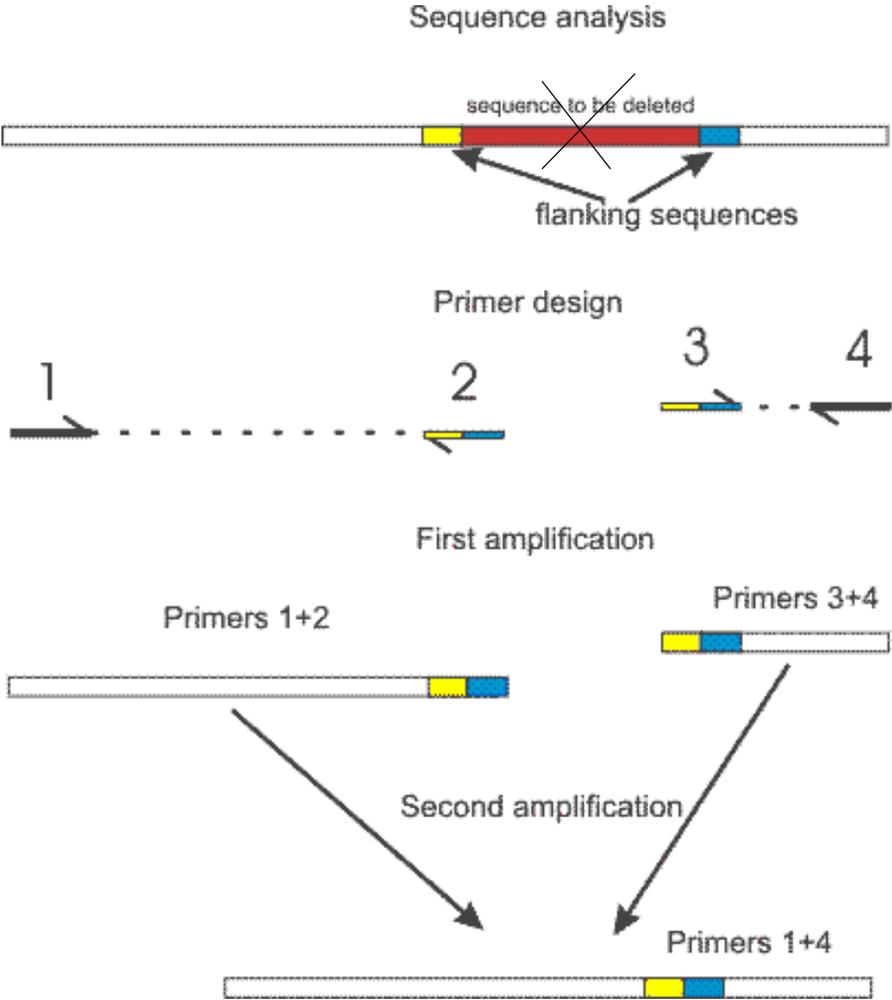
La mutagenesi *sito-diretta* può essere utilizzata anche per **introdurre in una sequenza (anche una singola base o poche basi)**: sfruttando la capacità di questi **oligonucleotidi** di appaiarsi al filamento di DNA anche se la sequenza non è perfettamente complementare.

L'oligonucleotide può poi essere utilizzato come innesco per una reazione di PCR dalla DNA polimerasi

La PCR serve poi ad amplificare il numero di copie del frammento di DNA mutato; **infine il gene modificato potrà essere clonato in un vettore d'espressione per produrre la proteina con l'aminoacido modificato nella posizione desiderata.**



Mutagenesi sito-specifica: delezione di una sequenza

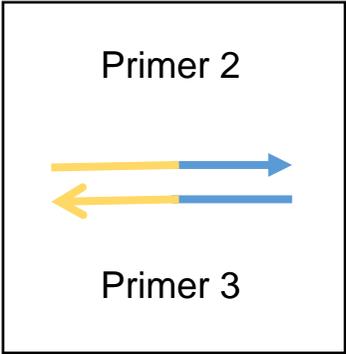


I

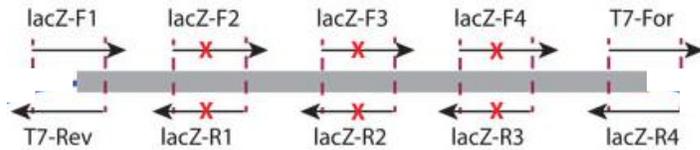
II

III

IV

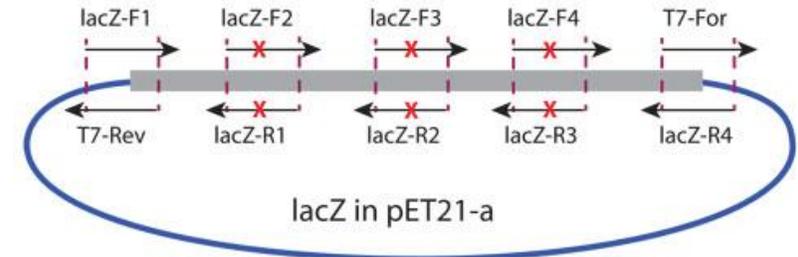


Mutagenesi sito-specifica: assemblaggio per PCR necessario ricostruire l'intero gene

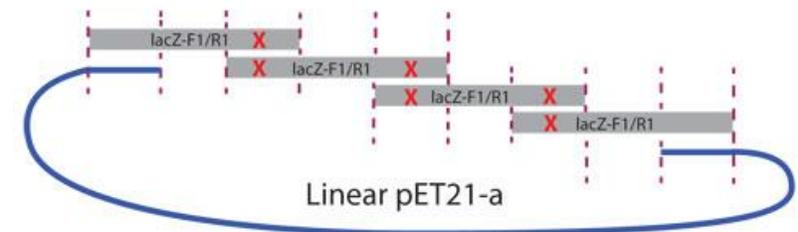


- PCR F1-R1
- PCR F2-R2
- PCR F3-R3
- PCR F4-R4
- Denaturate, mixati i filamenti
- PCR F1-R4
- clonaggio

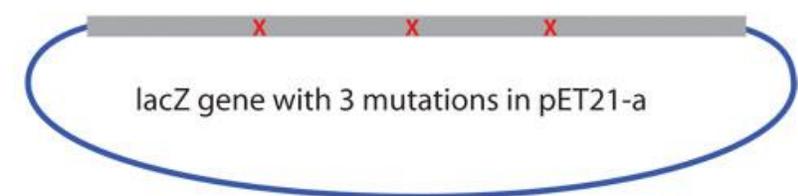
Usare taq ad alta fedeltà di sintesi per produrre frammenti più lunghi. Resta comunque il rischio di inserzione di mutazioni a causa dell'errore della Polimerasi durante l'estensione del filamento di sintesi.



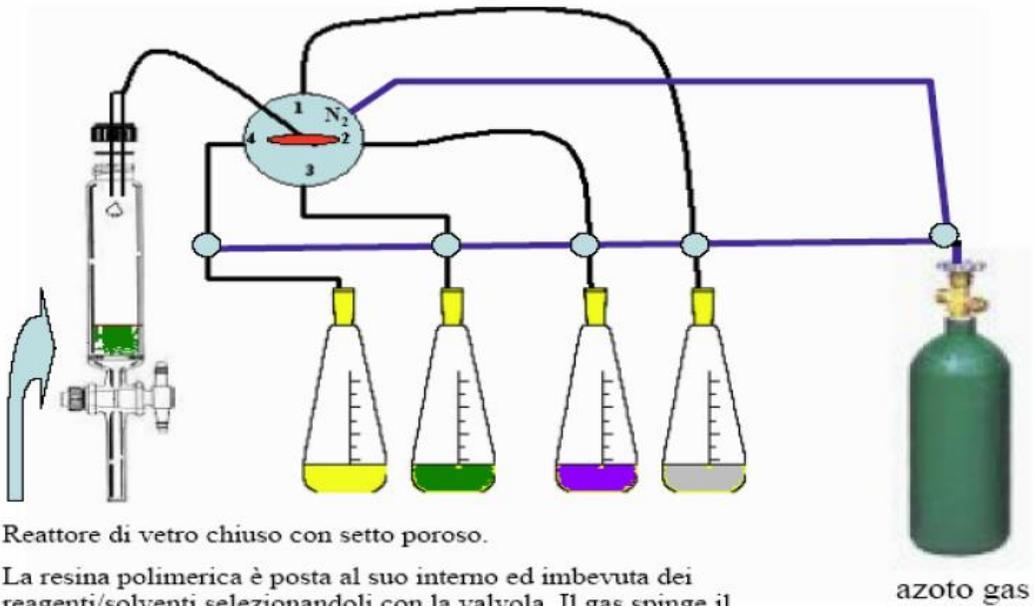
PCR to generate fragments with designed mutations for assembly.



Gibson Assembly Master Mix to join fragments at 50°C.



Sintesi del DNA automatizzata



ABI 392 DNA synthesizer (Applied Biosystem)

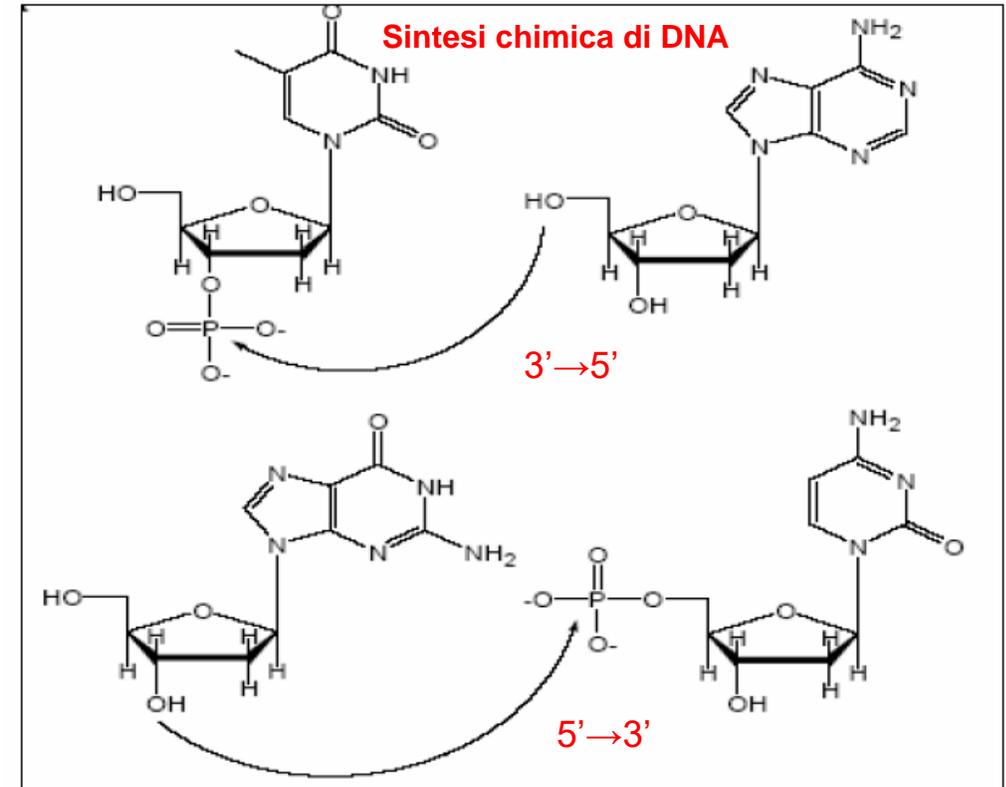
Mutagenesi sito-specifica: **sintesi diretta**, gene sintetico necessario ricostruire l'intero gene

Sintesi ex novo del gene:

1. Dalla sequenza aminoacidica della proteina, si può derivare al computer la sequenza nucleotidica (**back-translation**)
2. Ottimizzazione delle basi/codoni: senza inserire nucleotidi che potrebbero generare strutture secondarie, che potrebbero alterare il trascritto
3. Può essere utile inserire anche siti per RE in posizioni strategiche del frammento (per agevolare il clonaggio)

La sintesi di 100-150 bp è abbastanza affidabile.

Legame di frammenti sintetizzati di più piccole dimensioni per costruire il gene (laborioso).



http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/insegnamenti/documenti/02SINTESICHIMICADELDNA_000.pdf

Vettori fagemidi per la preparazione di sonde a RNA

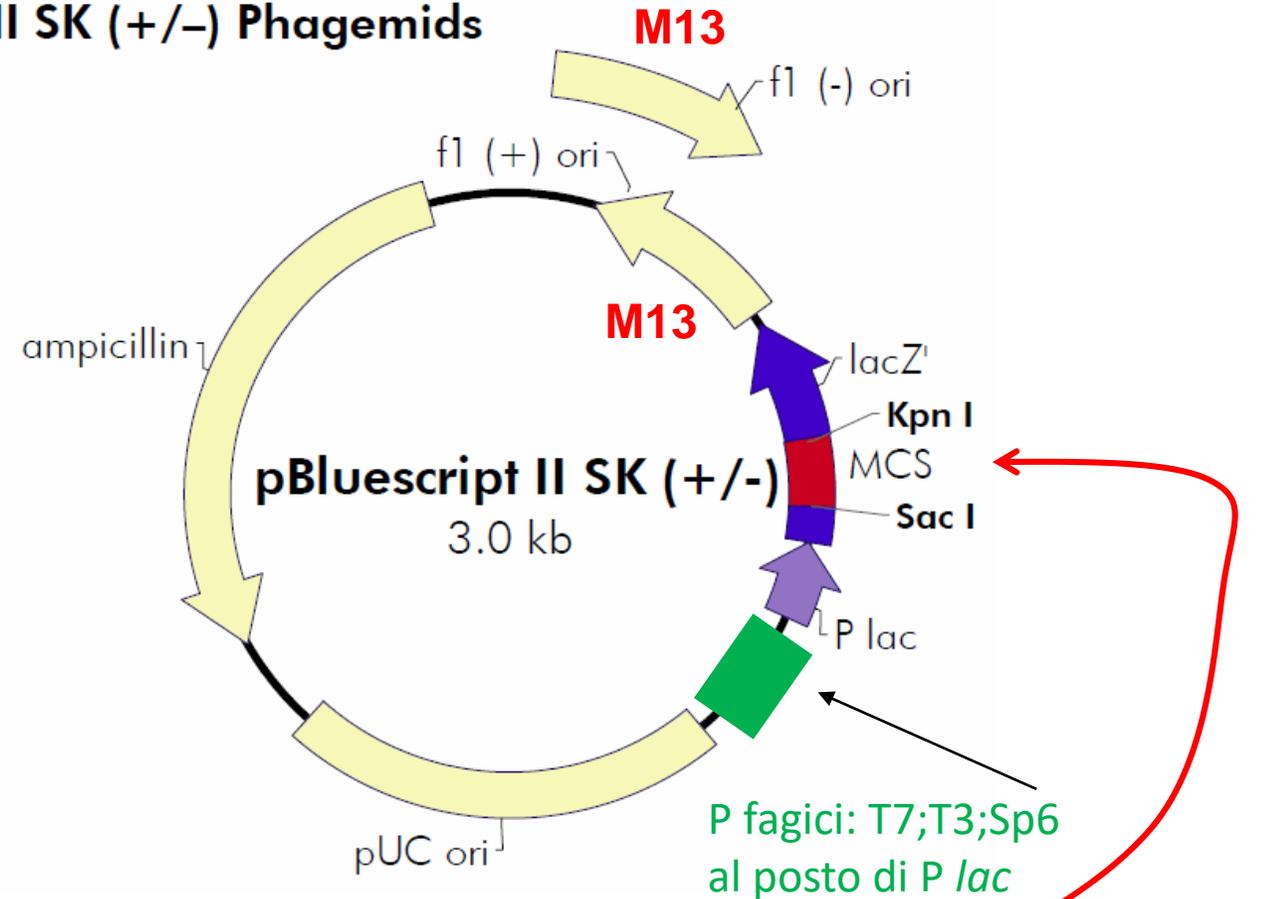
pBluescript II SK (+/-) Phagemids

Sono caratterizzati dalla presenza di:

1. **uno o più Promotori fagici per la trascrizione dell'inserto**, posto a monte del sito **MSC** (o a valle per produrre un mRNA antisense).
2. Sito multiplo di clonaggio (**MSC**)
3. **Origine di replicazione plasmidica (pUC ori)**
4. **Regione intergenica di 454 bp del fago filamentoso F1 (M13) (f1- ori e f1+ ori)**, comprendente l'origine di replicazione. L'orientamento (+) o (-) di tale regione consente la produzione di ssDNA
5. Gene per la **resistenza ad un antibiotico (Amp^R)**
6. Gene **lacZ** per la selezione bianco/blu dei ricombinanti

Caratteristiche dei promotori fagici T3, T7 ed Sp6:

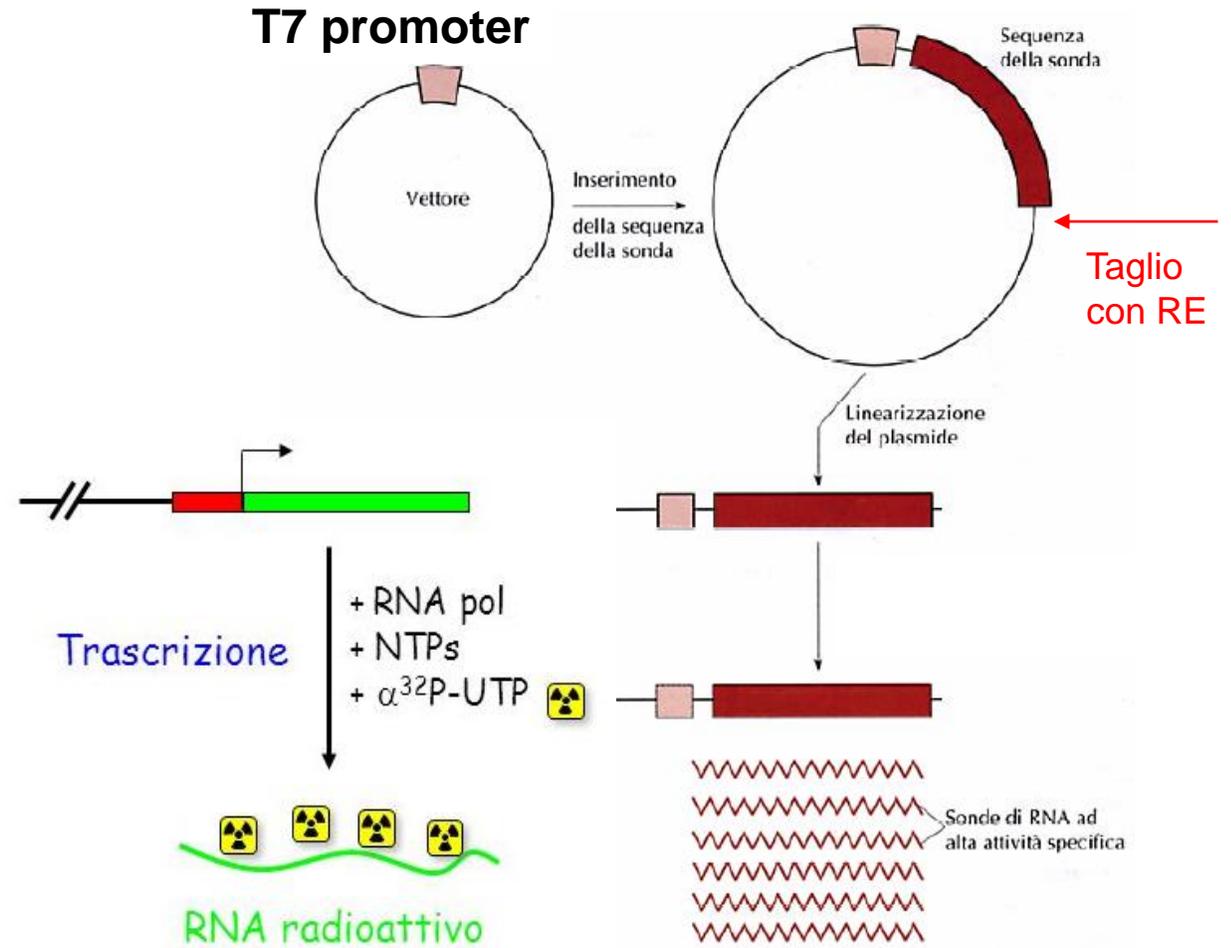
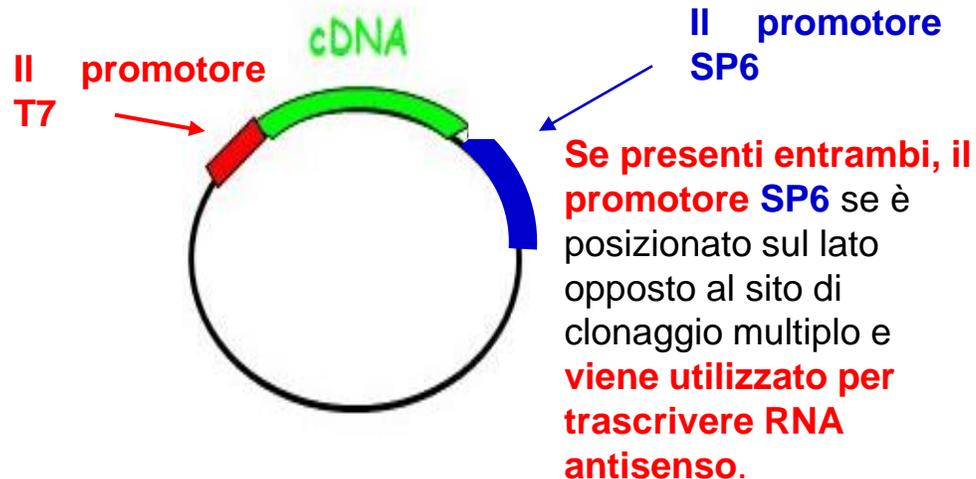
- sono promotori molto forti, alta efficienza di trascrizione
- **non sono riconosciuti dalla RNAPol di *E. coli***
- le RNAPol dei fagi T7, T3 ed Sp6 sono enzimi semplici da manipolare



Trascrizione *in vitro* di RNA

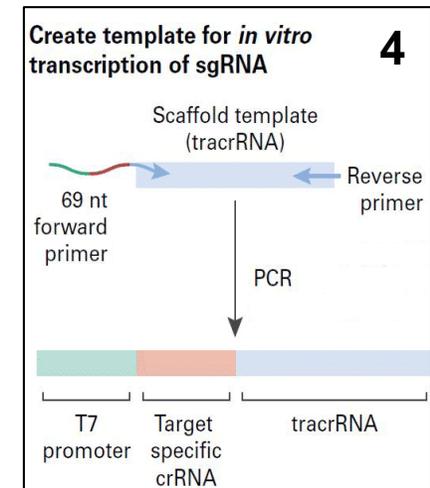
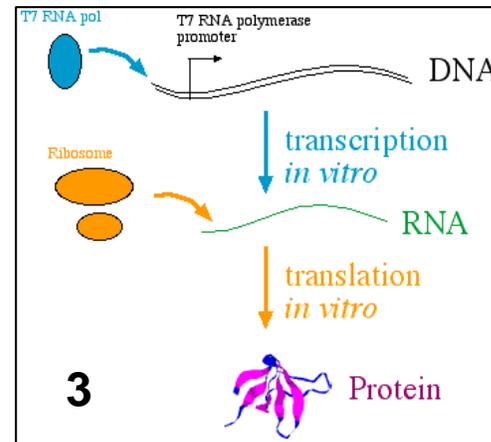
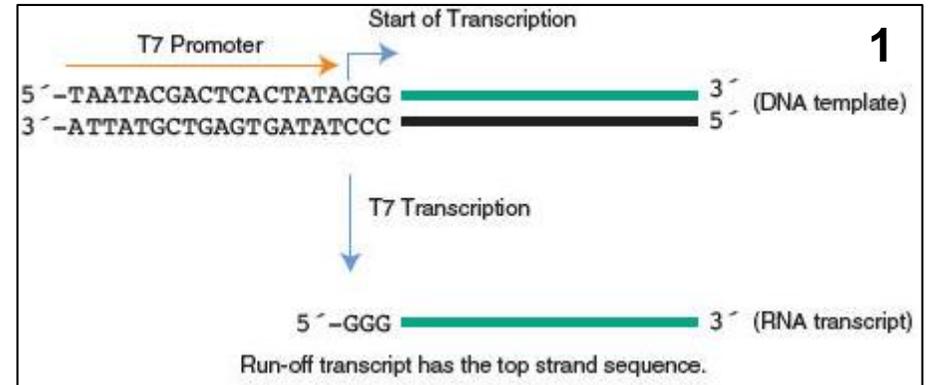
• Procedura

- Clonare il DNA stampo in un vettore contenente un promotore per le RNA polimerasi fagiche (T7 o SP6)
- Linearizzare il DNA stampo con enzimi di restrizione (*)
- Incubare in provetta DNA, ribonucleotidi trifosfato e RNA polimerasi
- Lasciare procedere la reazione per 1-2h a 37°C
- estrarre l'RNA



Vettori per la produzione di RNA: applicazioni

1. **Preparazione di sonde ad RNA** non marcate o anche radio-marcate, mediante **trascrizione *in vitro***
2. Studi di struttura e splicing dell'RNA
3. Preparazione RNA per produrre vaccini (RNA virali)
4. **Guide RNA** per il *gene targeting* nel sistema CRISPR/Cas9
5. mRNA per traduzione *in vitro translation* e **microiniezione**: produzione di esperimenti di **RNA antisenso** per studi modulazione dell'espressione genica in modelli animali *in vivo*
6. **Produzione di RNA templato** da retro-trascrivere per la costruzione di un template artificiale per allestire la curva standard **in saggi di PCR quantitativa assoluta**



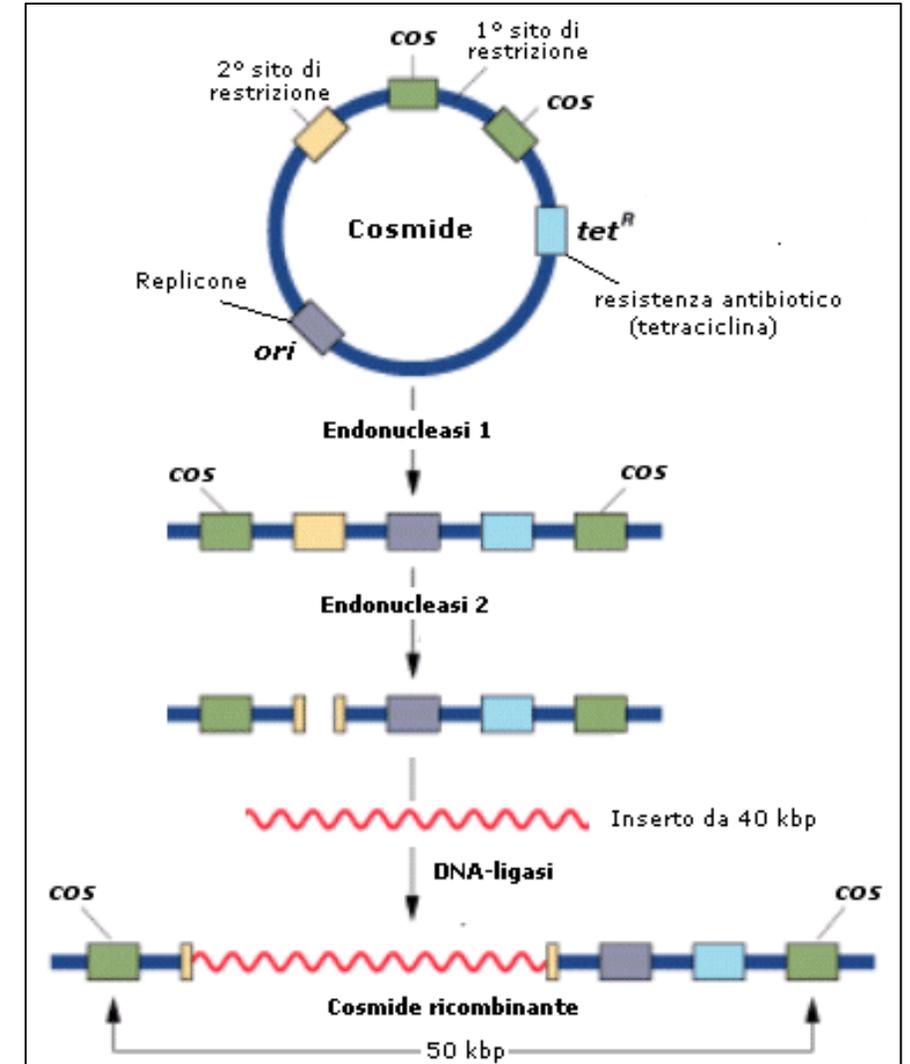
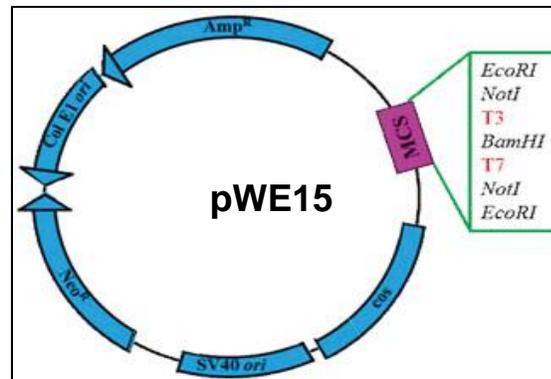
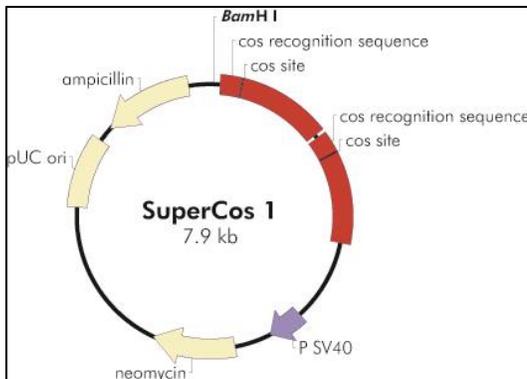
Cosmidi: per il clonaggio di genomi di dimensioni medio-piccole (o singoli geni) (non sufficienti per clonare l'intero genoma umano)

Vettori di clonaggio creati dall'uomo. Uniscono alcune **proprietà dei plasmidi e dei fagi**: si replicano come i plasmidi poiché contengono la sequenza **ori**, ma si impaccano nelle teste proteiche a formare le particelle virali come i fagi poiché contengono le estremità **cos**.

Elementi Strutturali importanti:

- ✓ Inizio di replicazione **ori**, non vi sono geni per la replicazione fagica o la lisi, quindi **non si formeranno placche**
- ✓ Sito **cos**, usato per *packaging in vitro*
- ✓ **Polylinker (pUC)**
- ✓ **Marcatori genetici selezionabili** (resistenza all'Ampicillina), per la selezione delle colonie ricombinanti

Dimensioni del cosmide: ~5 kb, l'inserto dovrà essere almeno di 32-45 Kb per consentire il packaging (37-51 Kb totali)



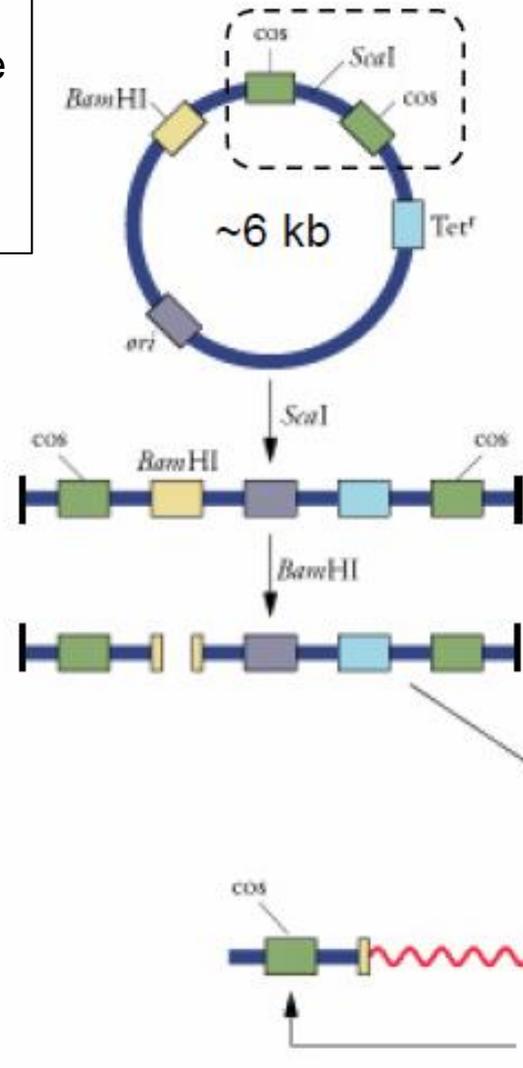
Clonaggio in Cosmidi

siti cos separati da un sito di restrizione per **Scal** (linearizzazione – mimante il fago):

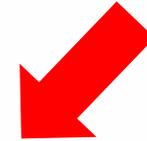
- digestione Scal
- e digestione BamHI

Blunt ends

Se riciclarizza, non avendo le dimensioni ottimali per il packaging **non origina placche di lisi**

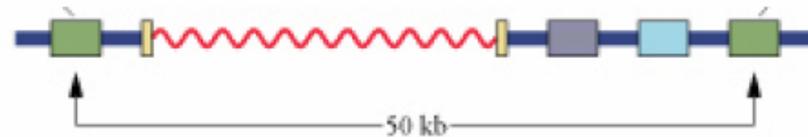


digestione BamHI

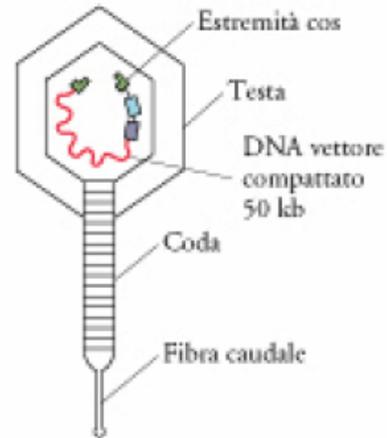


defosforilazione dei frammenti di DNA genomico **per evitare il legame tra due frammenti**, durante la reazione ligasica (non ci saranno inserti formati da multimeri)

Clonaggio in Cosmidi

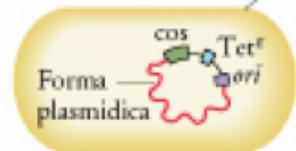


Impaccamento *in vitro*



Infezione

E. coli



Selezione tramite resistenza all'antibiotico

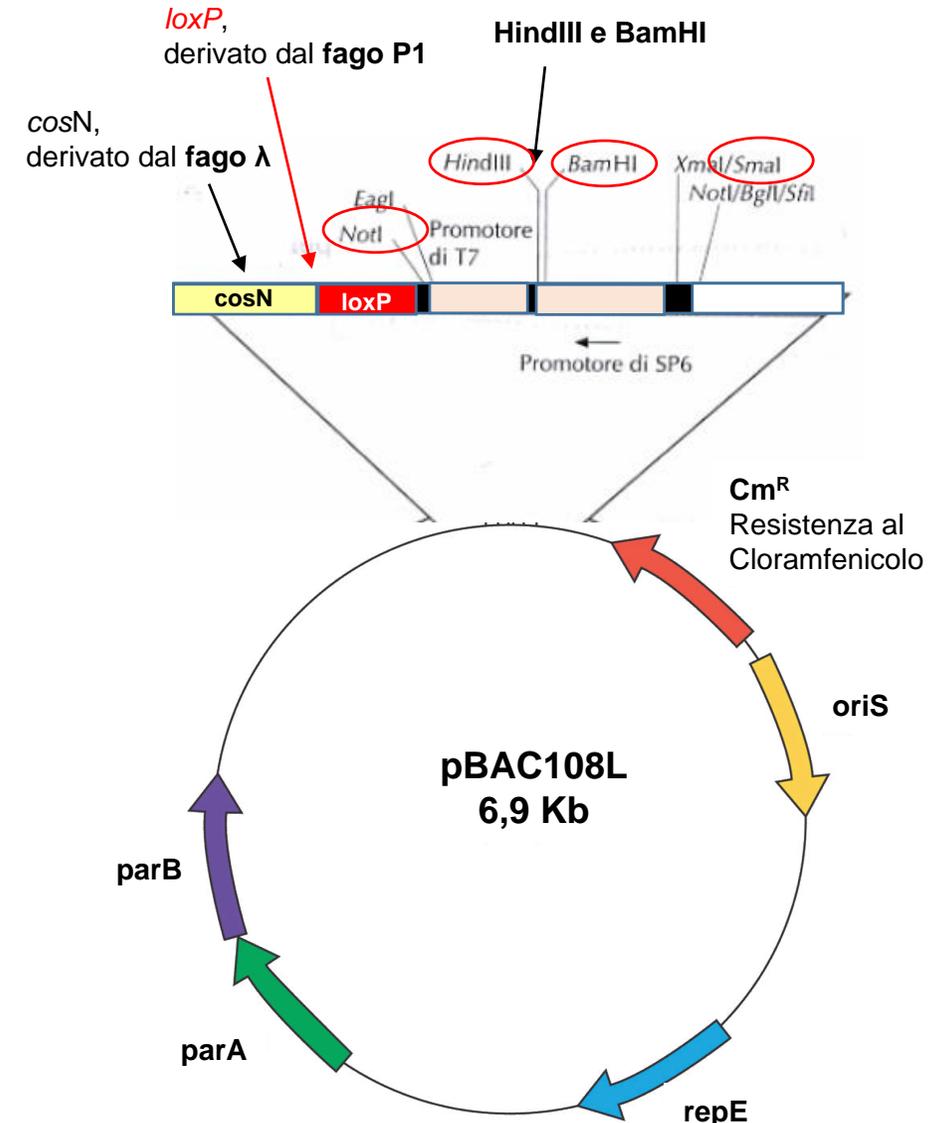
BAC (Bacterial Artificial Chromosome) - usato nel *shotgun*

Tipo di vettore chimerico che permette di inserire **fino a 300 Kb di inserto**, è stato creato usando come **modello il plasmide F** (fattore di fertilità responsivo della coniugazione batterica), grazie ai **geni del fattore F** che conferiscono al vettore **una bassa percentuale ricombinazione interna** è presente solo in 1 (o 2) copie come plasmide per cellula. **E' molto stabile nelle generazioni, ottimale per la produzione di genoteche.**

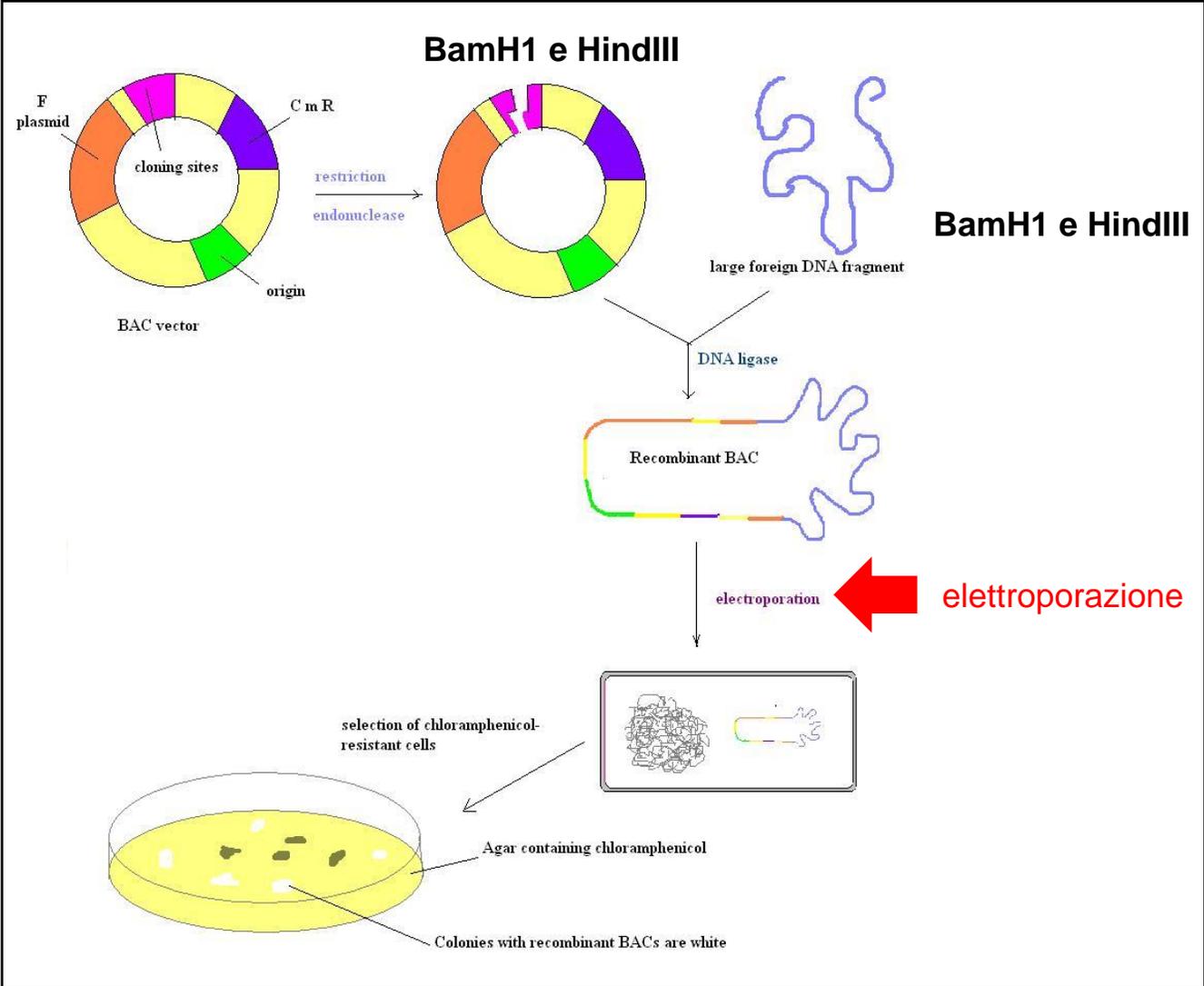
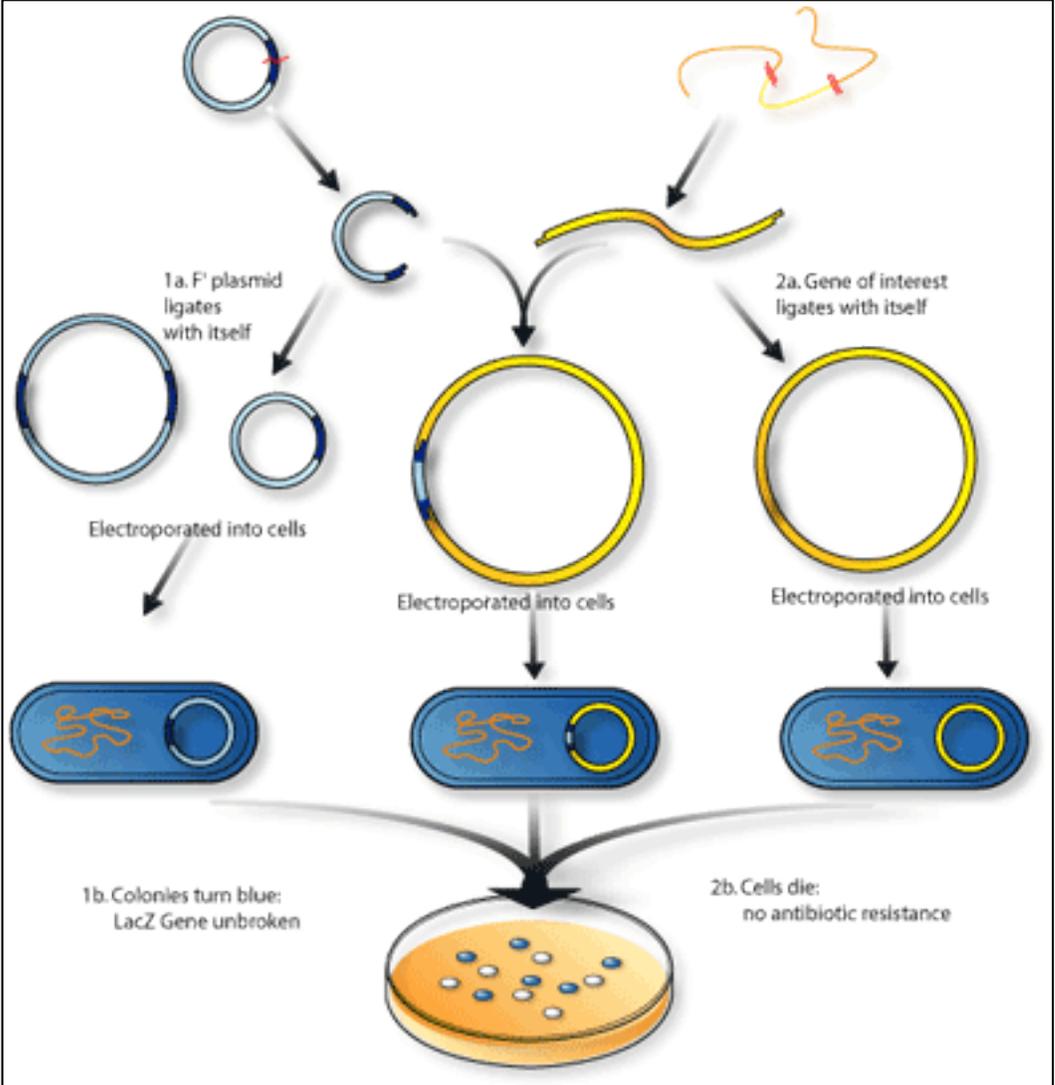
Per la trasformazione batterica molto usata l'**ELETTROPORAZIONE**.

Elementi strutturali importanti:

- Geni regolatori derivati dal fattore F** di *E. coli*:
 - **oriS**: origine di replicazione, consente la replicazione unidirezionale
 - **repE**: replicazione plasmidica e regolazione del numero di copie
 - **parA, parB**: mantenimento di un solo vettore per cellula, corretta ripartizione durante la mitosi, mantenimento della stabilità
- Resistenza al cloramfenicolo** (Cm^R)
- Segmento di clonaggio**:
 - **BamH1 e HindIII**: siti di clonaggio dell'inserto per due enzimi di restrizione
 - **T7 e SP6**: promotori fiancheggiati i siti di clonaggio per la eventuale generazione di sonde a RNA
 - **NotI, EagI, XmaI, SmaI, BglI e SfiI**: siti di restrizione
- alcuni BAC possiedono anche**:
 - **CosN**: sito di restrizione, tagliato dalla terminasi di fago lambda
 - **LoxP**: sito di restrizione, tagliato dalla proteina CRE del fago P1
 - **LacZ** (beta-galattosidasi): per la selezione **bianco/blu**



Clonaggio in BAC

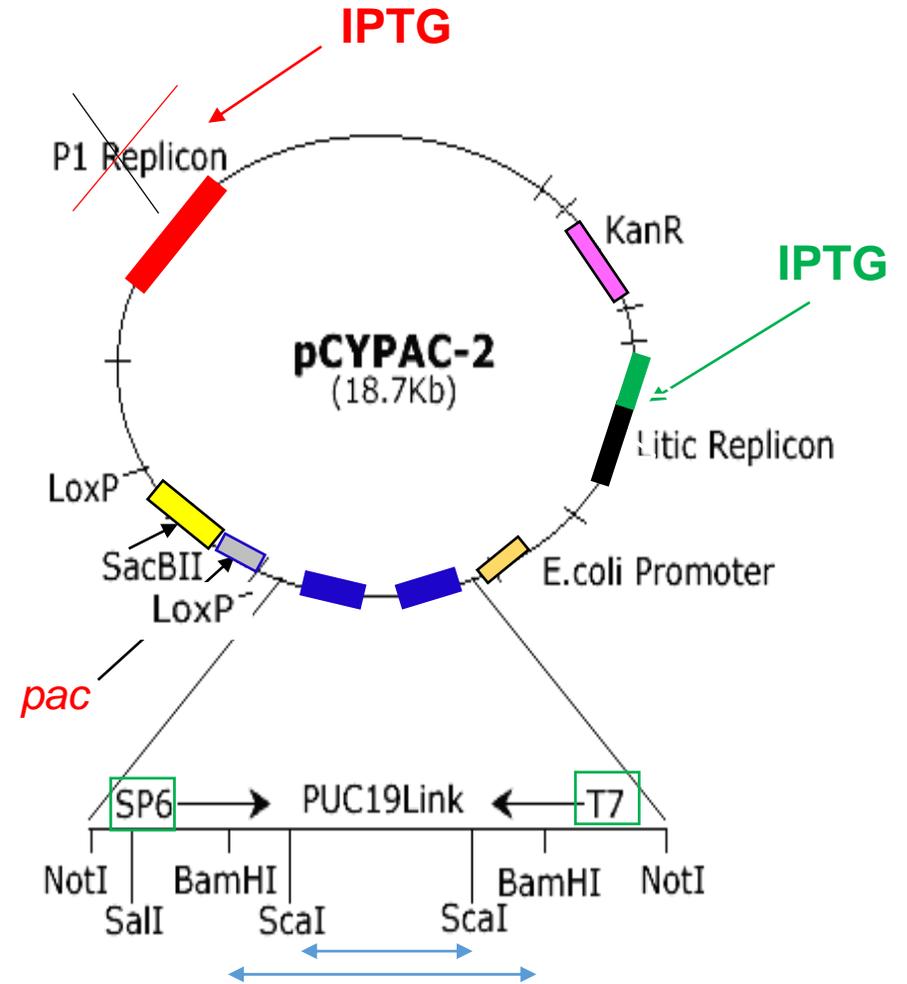


PAC (P1 derived Artificial Chromosome)

Combina le caratteristiche dei vettori BAC e del batteriofago P1 (simile al fago λ , presente nella forma non integrata), può avere **inserti anche fino a 300 Kb**, ma la dimensione più usata e **meglio gestita dal vettore è di 150 Kb**.

Elementi strutturali:

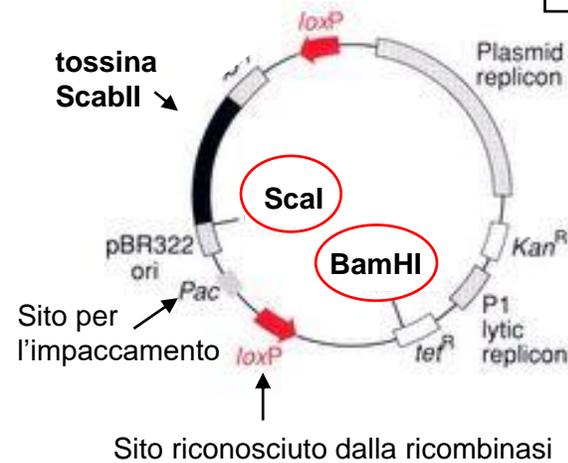
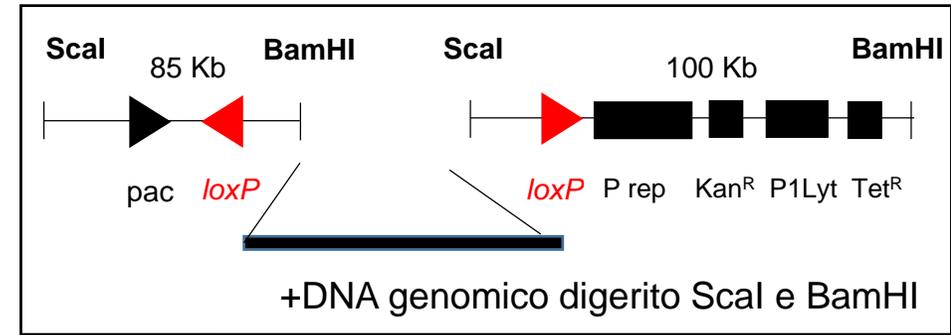
1. **P1 Replicon**: consente la replicazione 1 (o 2) copie per cellula conferendo al vettore una **bassa ricombinazione interna e stabilità**
2. **Lytic Replicon**: può però essere indotto al ciclo litico e ad una **replicazione in multicopia** con isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (**IPTG**), poiché posto sotto il controllo trascrizionale del **promotore del gene lacZ IPTG-inducibile**.
3. **Resistenza alla Kanamicina** (KanR), o altro antibiotico
4. **PUC19Link**: qui si inserisce il frammento da clonare, **BamH1** o **BamHI/ScaI** molto utilizzati
5. **T7 e SP6**: promotori fiancheggianti per produrre eventuali sonde ad RNA
6. **Sistema per la selezione** positiva dei ricombinanti: il prodotto del gene **SacBII** (controllato dal promotore di *E. coli*) **tossico per la cellula in presenza di saccarosio non può essere trascritto solo se presente l'inserto di DNA esogeno**
7. Gene codificante per **pac**, sito per il packaging del fago P1
8. **LoxP**: sito di restrizione, tagliato dalla ricombinasi **CRE del fago P1**



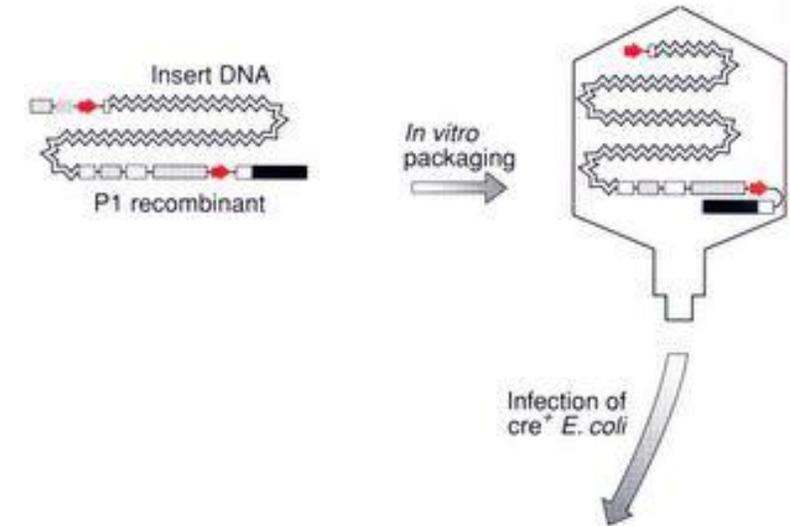
Usato nel Progetto Genoma Umano (Human Genome Project)

Clonaggio in PAC (DNA genomico di topo, uomo, drosofila)

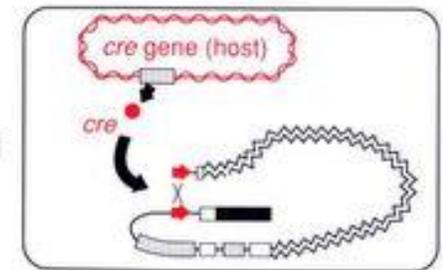
1. L'inserto ottimale è di **100-150 kb**
2. **Digestione con gli enzimi *SacI* e *BamHI***, produce due braccia distinguibili (corta e lunga) e loro **defosforilazione**
3. **Ligasi con l'inserto di DNA genomico della lunghezza (75-150 Kb)**
4. **Aggiunta di estratto proteico di packaging** del fago P1, contenente PAC, una **pacasi** che riconosce il sito *pac* e taglia il DNA e lo inserisce nella testa, poi attacco delle code (*packaging in vitro*)



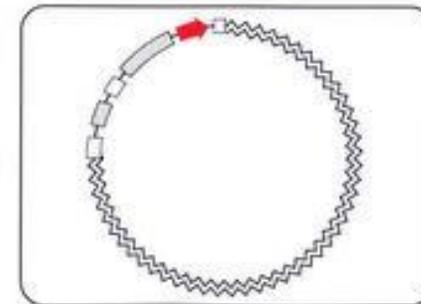
1. *BamHI* + *Scal*
2. Ligate to 75-100 kb DNA



Infection of *cre⁺ E. coli*



Circularization by *cre* recombinase



Induction of P1 lytic replicon

Amplification

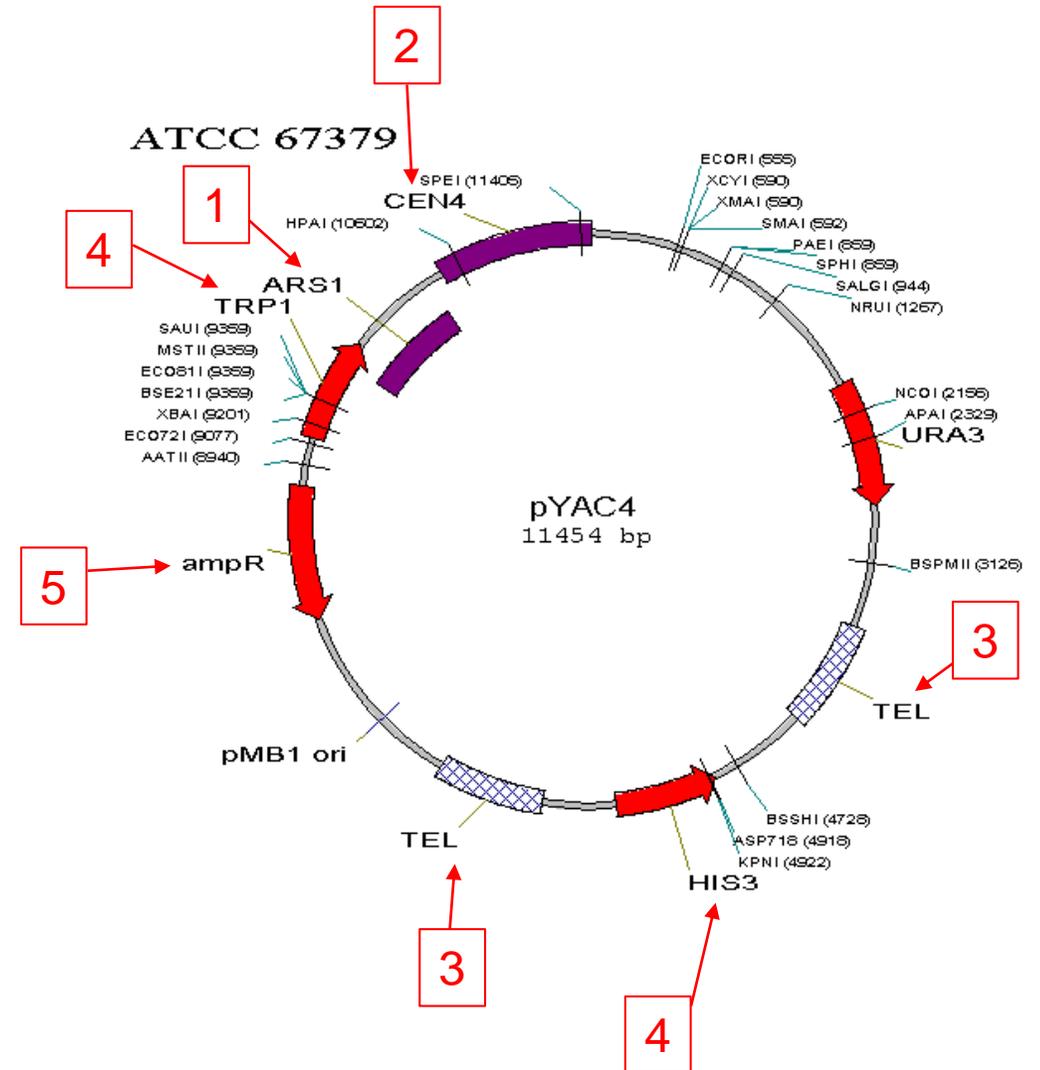
1. I fagi prodotti sono usati per infettare batteri *E. coli cre⁺*.
2. La **ricombinasi Cre** che catalizza la ricombinazione sito-specifica tra due sequenze bersaglio, quelle sul fago sono di 34 bp (**loxP**), **ricircularizza il DNA iniettato nell'ospite**.
3. Grazie all'origine **P1 replicon**, viene poi **mantenuto in un basso numero di copie**. La **produzione** di un numero elevato di copie è ottenuta invece inducendo con **IPTG** l'operone P1 litico sotto il controllo del promotore del gene *lac*.

The phage P1 vector system allows DNA fragments of up to 100 kb to be cloned.

YAC (Yeast Artificial Chromosome): lievito come ospite per clonare genomi degli eucarioti superiori

1. **ARS:** Autonomously Replicating Region Sequence: sequenza di **replicazione autonoma di lievito**.
2. **CEN:** è una sequenza di 125 bp tratta dai cromosomi di lievito che **permette una segregazione regolare** dei vettori **durante la mitosi** delle cellule.
3. **TEL:** è una sequenza di 13 bp ripetuta molte volte. E' tratta dai **telomeri dei cromosomi di lievito** e serve a dare **stabilità** al vettore.
4. **Marcatori di selezione:** **geni implicati nella biosintesi di uno specifico nutriente**, in genere un amminoacido. I marcatori più utilizzati sono: **His3, Leu2, Trp1, Lys2, Ura3**.
Il ceppo di lievito utilizzato nella trasfezione deve essere difettivo per la via biosintetica in questione. I ceppi che hanno internalizzato il vettore vengono identificati per la loro capacità di complementare il difetto nutrizionale, pertanto vengono fatti crescere **su un terreno privo dello specifico nutriente**.
5. **Resistenza ad un antibiotico:** ampicillina

Vantaggi: si possono clonare frammenti di DNA molto grandi (fino a 1 Mb)
Svantaggi: i costrutti sono difficili da manipolare perché fragili e nell'ospite tendono a ricombinare.



Clonaggio in YAC

1. Il vettore viene digerito con **due enzimi, EcoRI e BamHI**, che invece taglia due volte tra i telomeri, per la produzione dei due **braccia che vengono defosforilate** per impedirne la riassociazione
2. **Digestione enzimatica del DNA genomico da clonare con gli stessi RE** e selezione dei frammenti con dimensioni di 85-100 kb (e oltre...)
3. Reazione di **ligasi** per saldare i frammenti di DNA genomico ai bracci. La stabilità del vettore dipende dalle dimensioni dell'insero
4. **Il vettore si può propagare anche nella forma lineare**
5. Selezione dei ricombinanti con **entrambi i marcatori** portati sui due bracci.

