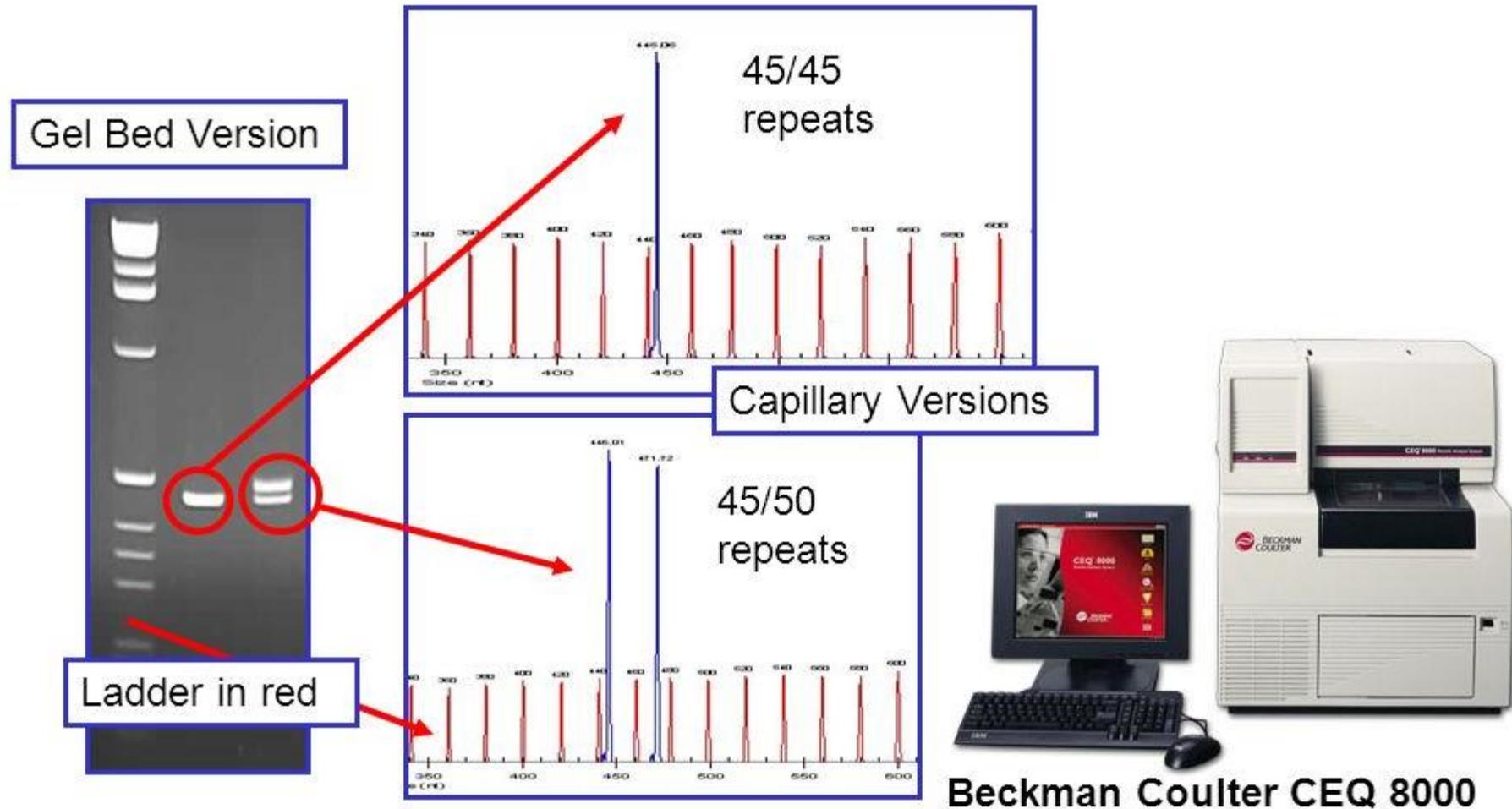


# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

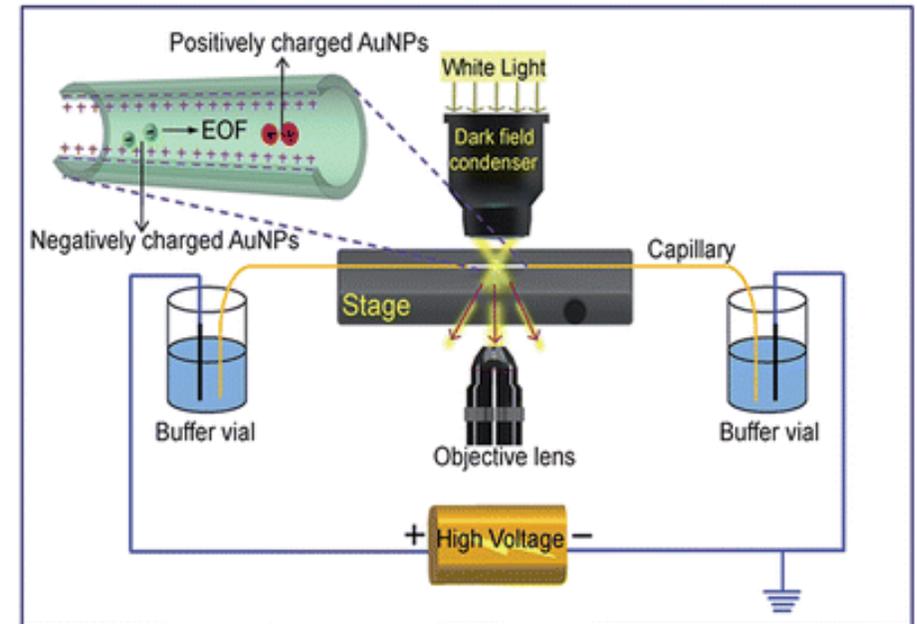


# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

L'elettroforesi capillare (CE) è un'alternativa all'elettroforesi convenzionale su gel per la separazione di frammenti di DNA.

**Vantaggi rispetto alle separazioni su gel:**

- ❑ **Velocità**, tempi di separazione rapidi (anche solo pochi minuti)
- ❑ **Alta risoluzione** (risoluzione di una singola base può essere ottenuta su frammenti delle dimensioni anche fino a diverse centinaia di bp e in presenza di standard appropriati)
- ❑ **Alta sensibilità** (la quantità di DNA richiesto per la separazione è mediamente nel range di ng)
- ❑ **Facile la gestione dei dati**
- ❑ DNA viene rilevato mediante assorbimento nello spettro **UV** o mediante marcatura con molecole fluorescenti

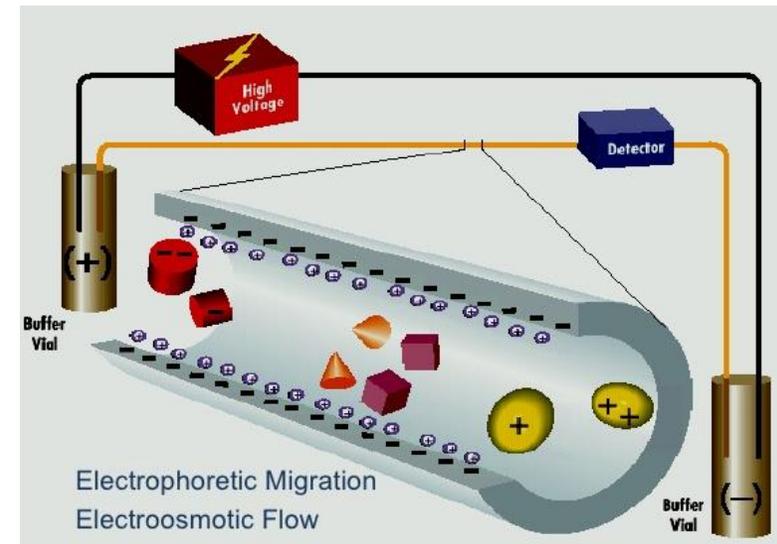
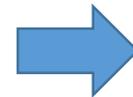
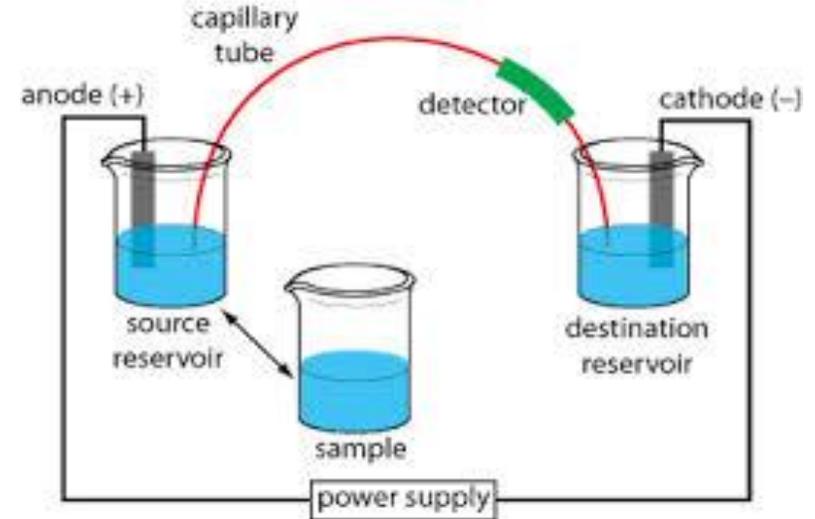
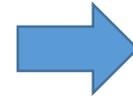


# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

Le componenti principali del sistema sono: una *vial* contenente il campione, due *vials* di origine e di destinazione per l'immersione delle estremità del capillare durante la corsa, il capillare, gli elettrodi, un alimentatore ad alta tensione, un sistema di rilevamento ed elaborazione dei dati e dispositivi di movimentazione per lo spostamento automatizzato delle *vials*.

La *vial* col campione, quelle al catodo e all'anodo per la corsa ed il capillare sono riempiti con un elettrolita, una soluzione di tampone acquoso. Per introdurre il campione nel capillare viene applicata un'alta pressione o un alto voltaggio (elettrocinetica), quindi un'estremità del capillare viene automaticamente spostata sulla *vial* posta all'anodo.

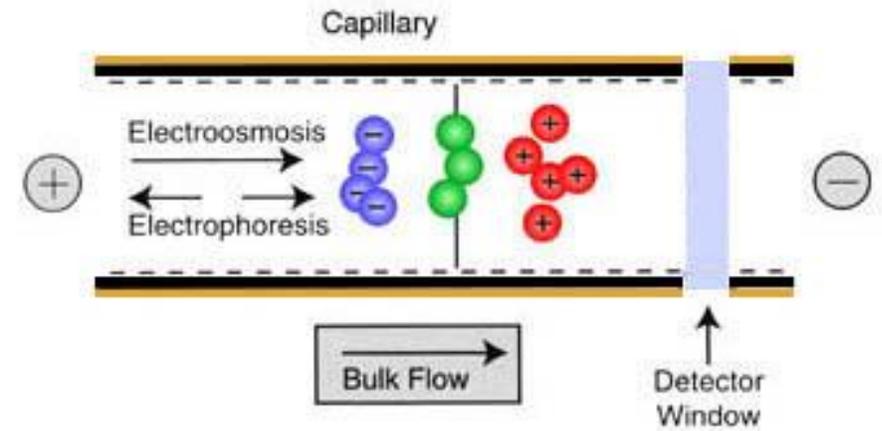
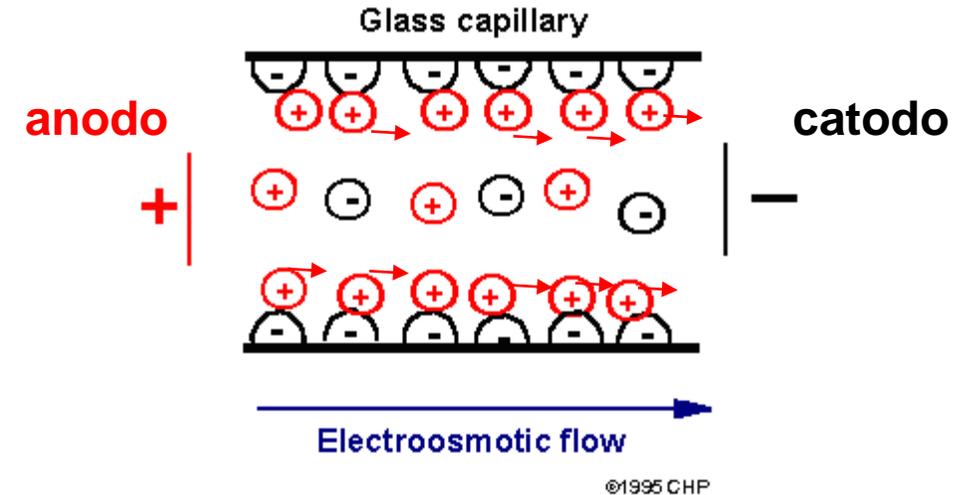
La migrazione elettroforetica avviene grazie all'applicazione di un campo elettrico tra i flaconi di origine e di destinazione, attraverso l'alimentazione ad alta tensione.



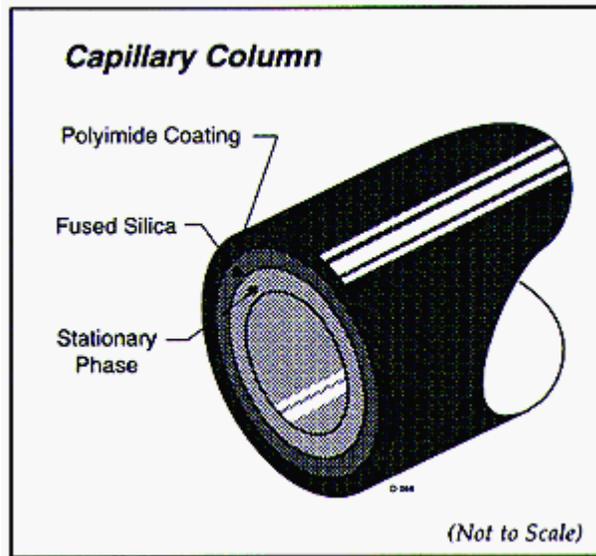
# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

La superficie di silice del capillare di vetro contiene cariche negative, queste costituiscono gruppi funzionali che attraggono le cariche positive presenti nel tampone salino. Le cariche positive migreranno verso l'elettrodo negativo trascinando con se nella stessa direzione le molecole disciolte provocando il cosiddetto **flusso elettrosmotico (EOF)**. In questa situazione le molecole cariche positivamente si muovono più velocemente di quelle negative (che saranno invece ostacolate da questo flusso nel verso opposto).

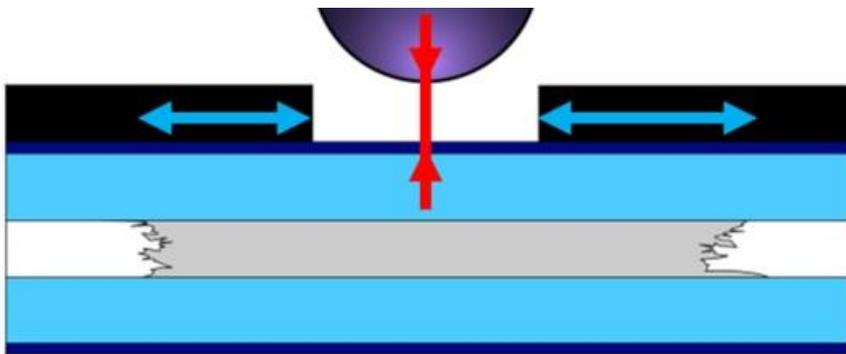
La velocità di migrazione di un analita in elettroforesi capillare dipenderà anche dalla velocità del flusso elettrosmotico della soluzione tampone. In un sistema tipico, il flusso elettrosmotico è diretto verso il catodo caricato negativamente in modo che il buffer scorre attraverso il capillare dalla fiala sorgente alla fiala di destinazione. Gli analiti presentano pertanto diverse mobilità elettroforetiche. Come risultato, analiti caricati negativamente sono attratti verso l'anodo caricato positivamente, in contrasto con l'EOF, mentre analiti caricati positivamente sono attratti dal catodo, in accordo con l'EOF.



# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA



- ❑ La separazione di molecole in elettroforesi capillare avviene in base alle **caratteristiche fisiche**
- ❑ L'applicazione di un **alto voltaggio (10-30 kV)** attraverso il tampone che riempie il capillare ha permesso di aumentare il range di separazione
- ❑ Diametro interno dei capillari tipicamente 50  $\mu\text{m}$
- ❑ Lunghezza del capillare da 0,5-1 metro
- ❑ Capillare riempito con buffer e/o gel



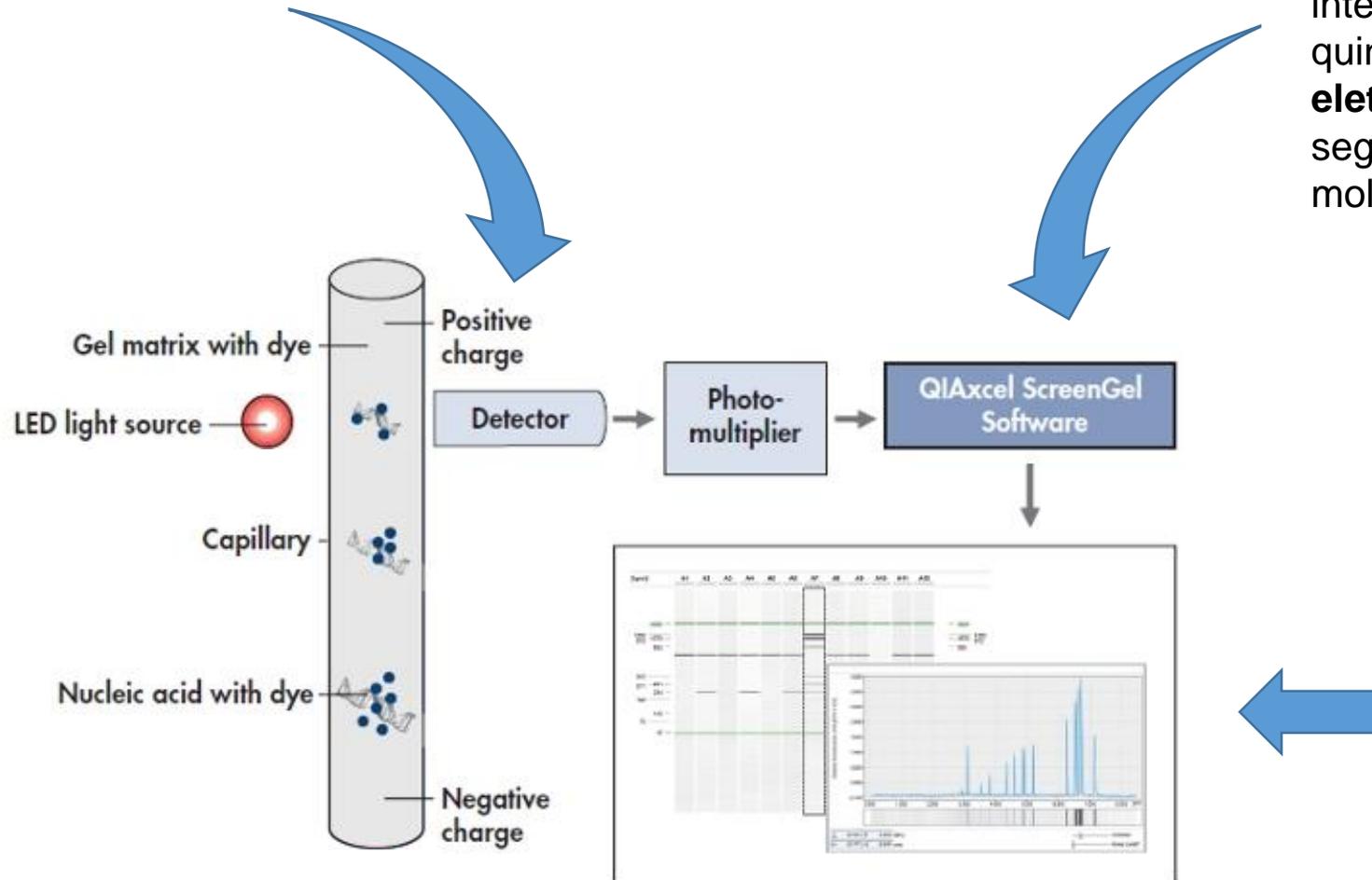
La separazione di **molecole** in CE può essere analizzata da diversi dispositivi di rilevamento. La maggior parte dei sistemi utilizzano l'assorbanza all'UV. In questi sistemi, una porzione del capillare stesso viene utilizzata come «cella» di rilevamento.

I capillari sono rivestiti con un polimero (spesso poliimmide o Teflon) che conferisce una maggiore flessibilità. La porzione del capillare utilizzato per il rilevamento UV deve essere otticamente trasparente. Per capillari rivestiti da poliimmide, un segmento del rivestimento è tipicamente bruciato o asportato per fornire una «finestra» trasparente di diversi millimetri di lunghezza. Questa sezione nuda del capillare può rompersi facilmente, quindi sono stati prodotti anche capillari con rivestimenti trasparenti per aumentare la stabilità della finestra della «cella».

# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

Gli analiti migrano a causa della loro mobilità elettroforetica, e vengono rilevati in prossimità dell'estremità di uscita del capillare.

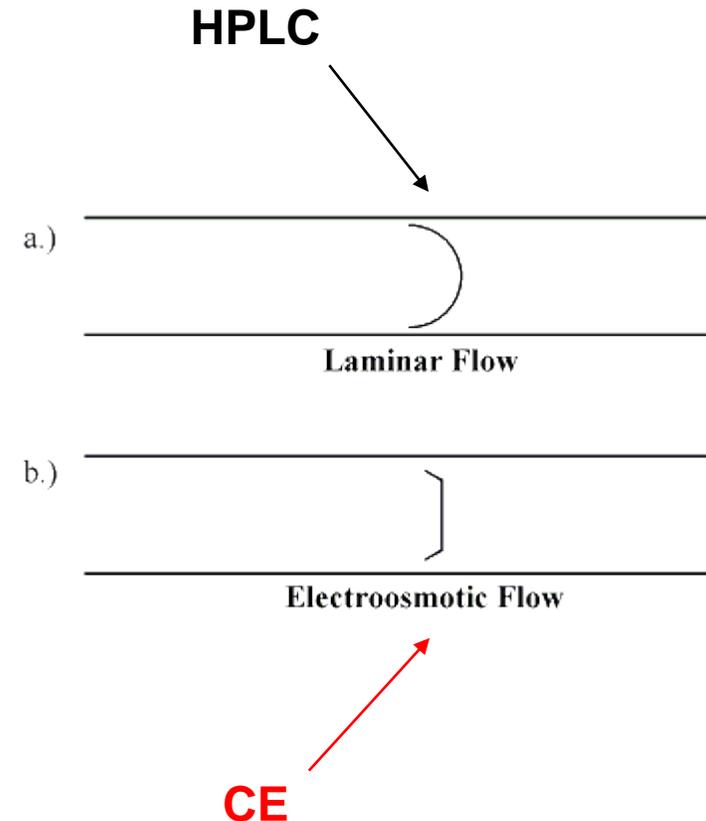
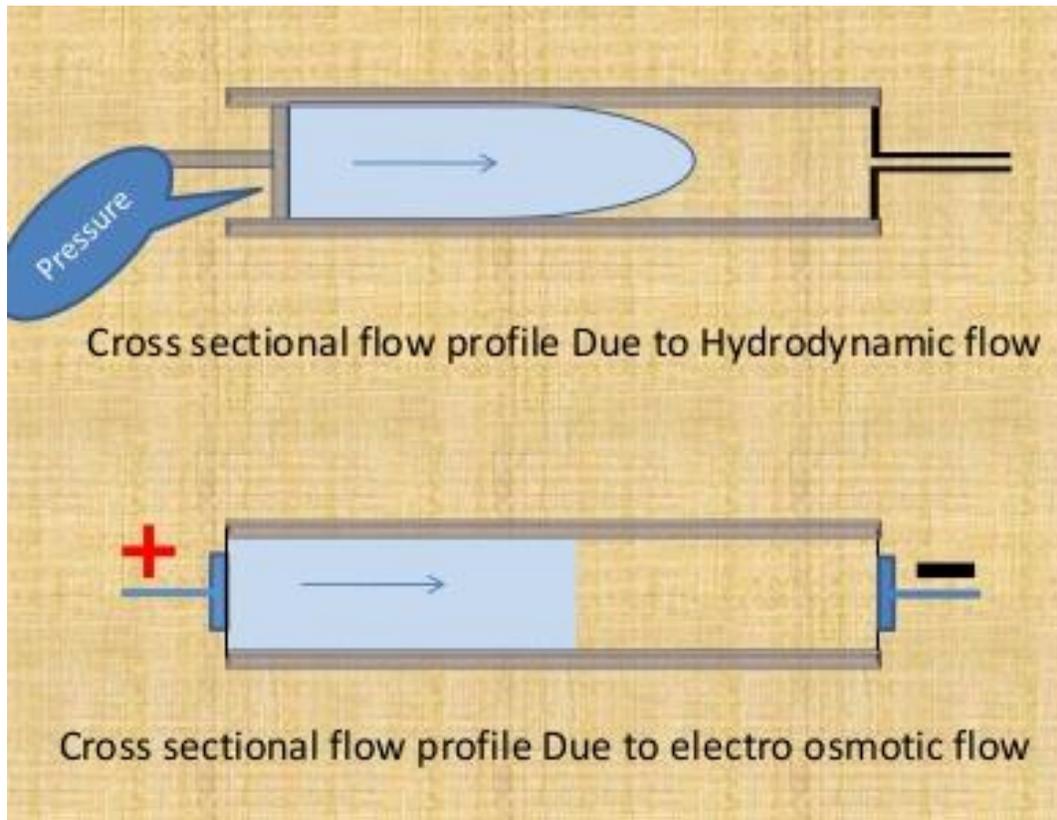
Il segnale al *detector* viene inviato ad un sistema di elaborazione dati, un integratore o computer. I dati vengono quindi visualizzati come un **elettroferogramma**, che riporta il segnale (picco) di rilevazione della molecola in funzione del tempo.



Gli acidi nucleici o frammenti di DNA separati appaiono come picchi con differenti tempi di ritenzione in un elettroferogramma.

# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

L'efficienza delle separazioni di acidi nucleici (o altre molecole) in elettroforesi capillare è in genere molto superiore rispetto all'efficacia di altre tecniche di separazione, come l'HPLC. Diversamente dall'HPLC, in CE il profilo di flusso è piatto, piuttosto che arrotondato (flusso laminare) caratteristico del flusso guidato dalla pressione nelle colonne cromatografiche.

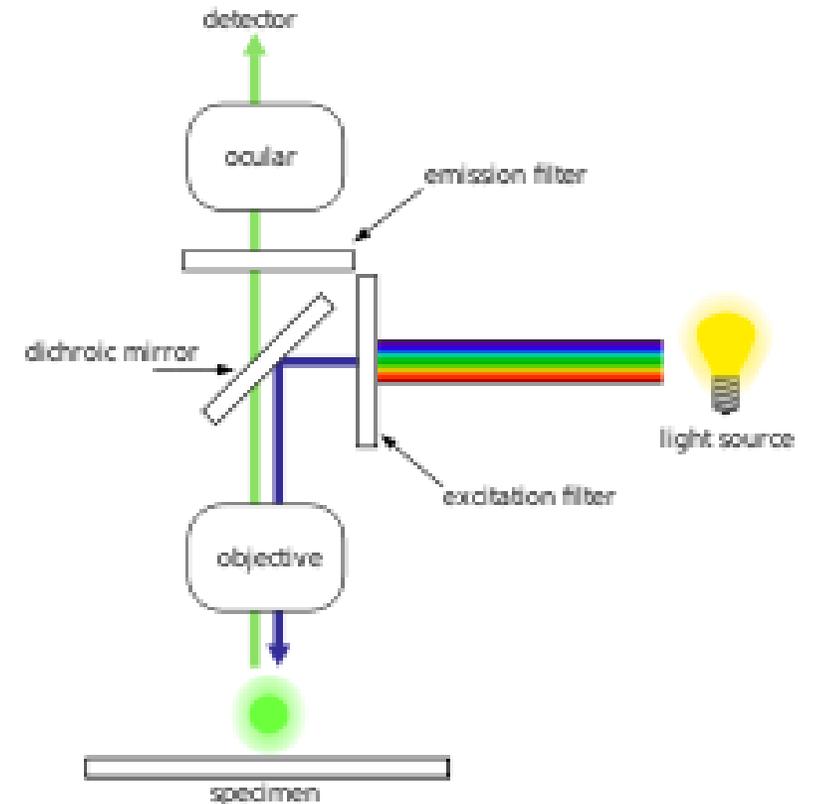


# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

La rilevazione della fluorescenza può essere utilizzato anche in elettroforesi capillare per campioni naturalmente fluorescenti o modificati chimicamente per contenere *marcature* fluorescenti. Questa modalità di rilevamento offre **alta sensibilità** e una migliore selettività, ma non può essere utilizzata per campioni che non sono fluorescenti. Numerose strategie di «**marcatura**» vengono usati per creare derivati fluorescenti o coniugati con molecole, sia per le proteine e per il DNA.

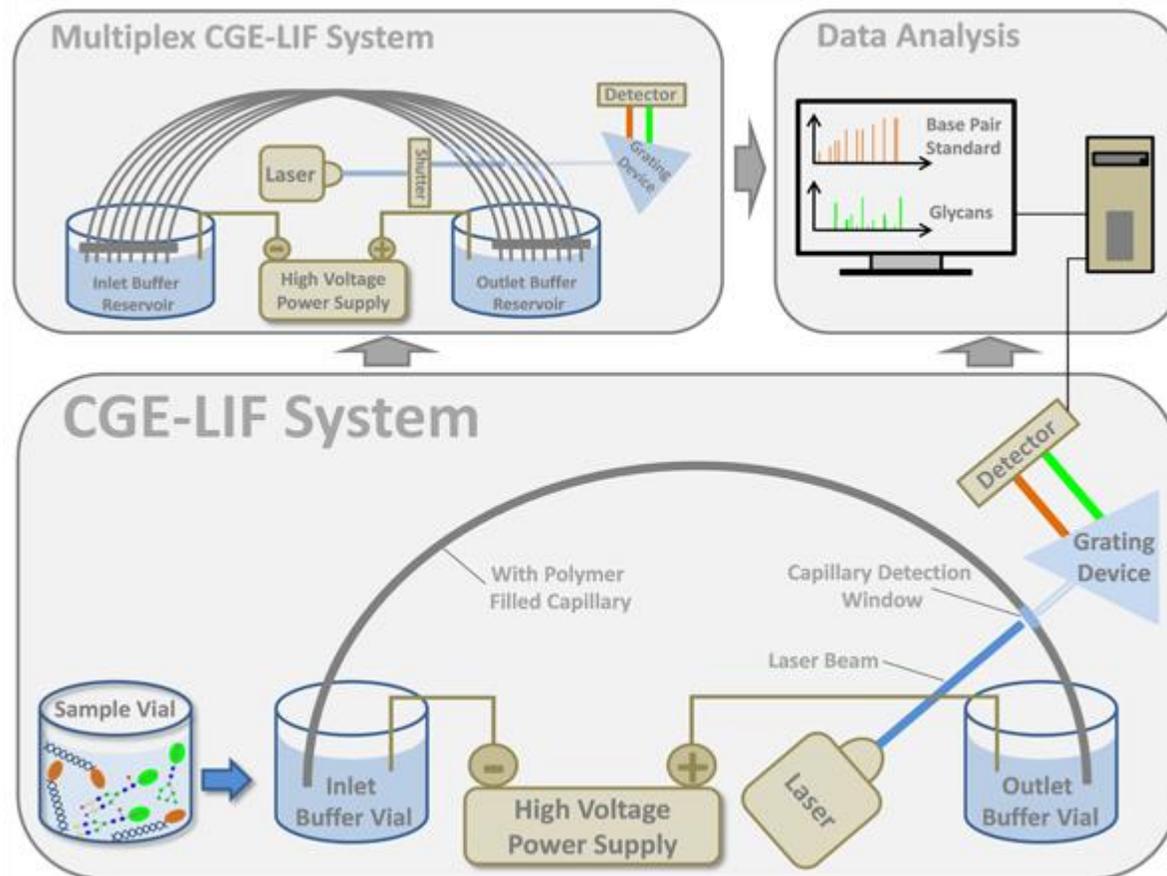
Il set-up per la rilevazione della fluorescenza in un sistema di elettroforesi capillare può essere complicato. Il metodo richiede che il fascio di luce venga focalizzato sul capillare, ciò può essere difficile per molte sorgenti luminose.

La fluorescenza indotta da laser è stata applicata sistemi CE riuscendo così a spostare i limiti inferiori di rilevazione a partire da  $10^{-18}$  a  $10^{-21}$  mol. La sensibilità della tecnica è attribuita **all'alta intensità della luce incidente** e la **capacità di focalizzare** con precisione la luce sul capillare.

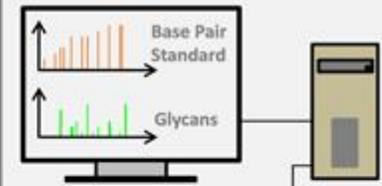


# Elettroforesi Capillare (CE) nell'analisi del DNA

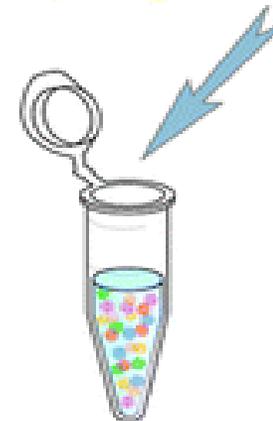
Il rilevamento di fluorescenza multi-colore può essere raggiunto includendo molteplici specchi dicroici e filtri per separare l'emissione di fluorescenza. Sistemi CE con rilevamento LIF a 4 e 5 colori sono usati di routine per il sequenziamento del DNA in elettroforesi capillare per la genotipizzazione di campioni di DNA (*DNA fingerprinting*).



Data Analysis



126	275	Sample 1
127	274	Sample 2
128	273	Sample 3
129	272	Sample 4
130	271	Sample 5
131	270	Sample 6

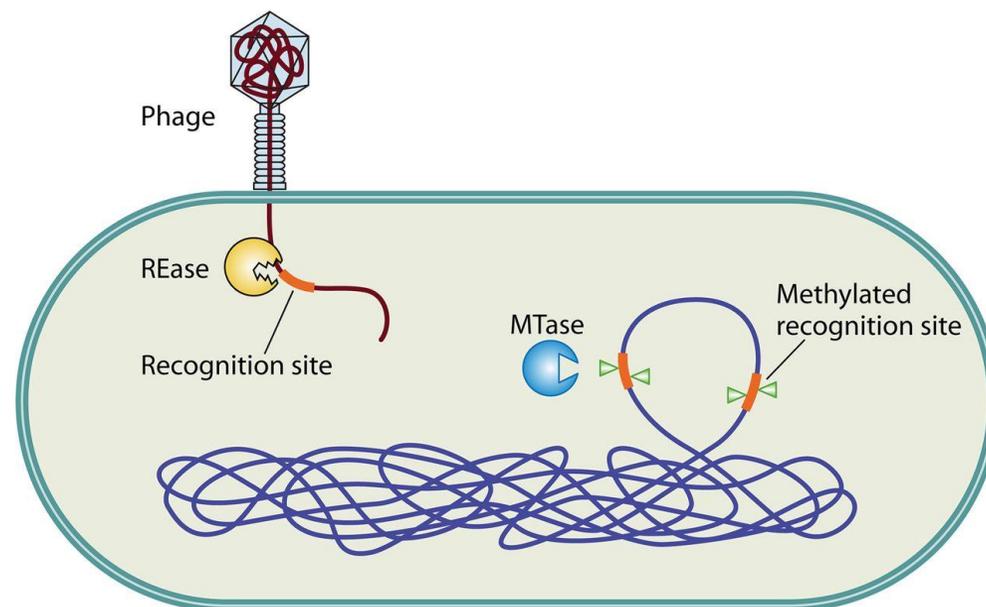


# Enzimi di Restrizione

Nel 1970 identificate in *E. coli* le prime endonucleasi di restrizione: sistemi di difesa dalle infezioni di batteriofagi

Gli enzimi di restrizione sono classificati in **4 tipologie**:

- Composizione in più subunità**
- Posizione di taglio**
- Specificità di sequenza e**
- Richiesta di un cofattore per esplicare l'attività**



\* Tuttavia, col sequenziamento amminoacido delle proteine sono stati scoperti una moltitudine di enzimi di restrizione, tant'è che a livello molecolare, sono stati caratterizzati più di quattro tipi diversi

# Enzimi di Restrizione

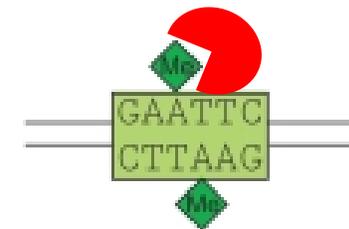
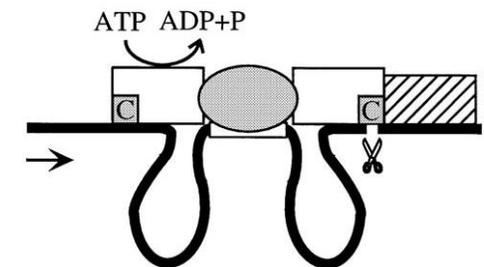
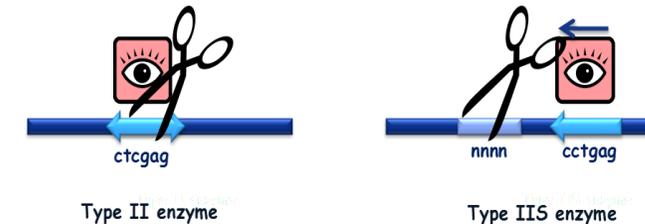
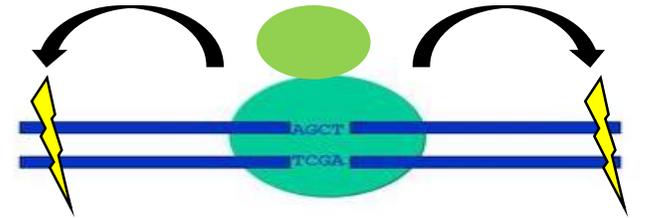
**Tipo I:** sono enzimi complessi, costituiti da subunità multiple, **tagliano il DNA in modo casuale lontano anche 1000 bp dal sito di riconoscimento sul DNA**. Sono enzimi che hanno scarso valore pratico poiché non producono frammenti di restrizione discriminabili e distinguibili come bande definite in gel d'agarosio.

**Tipo II:** questi enzimi **tagliano il DNA in posizioni precise in prossimità o all'interno delle loro sequenze di riconoscimento**. Essi producono frammenti di restrizione definiti e distinguibili come bande in gel, **sono l'unica classe utilizzata in laboratorio per l'analisi del DNA di routine e per il clonaggio genico**. Sono un insieme di proteine non correlate, spesso differiscono completamente nella loro sequenza aminoacidica; sono spesso coinvolte nelle interazioni ospite-parassita. Non usano ATP e usualmente necessitano di  $Mg^{2+}$  come cofattore.

**Tipo III:** tali enzimi **tagliano 20-30 bp al di fuori delle loro sequenze di riconoscimento** e richiedono **due sequenze in orientamenti opposti** all'interno della stessa molecola di DNA per realizzare scissione; raramente danno digestioni complete. Usano ATP.

**Type IV:** enzimi che riconoscono DNA modificati, **tipicamente DNA metilato**. Necessitano di  $Mg^{2+}$  come cofattore.

**\*Type V:** enzimi di restrizione artificiali



# Enzimi di Restrizione tipo II

Gli enzimi di tipo II sono quelli come **HhaI**  $5' \dots \text{GCGC} \nabla \dots 3'$   
 $3' \dots \text{CGCG} \blacktriangle \dots 5'$ , **HindIII**  $5' \dots \text{A} \nabla \text{AGCTT} \dots 3'$   
 $3' \dots \text{TTCGA} \blacktriangle \text{A} \dots 5'$ , e **NotI**  $5' \dots \text{GCGGCGCGC} \dots 3'$   
 $3' \dots \text{CGCCGGCG} \dots 5'$ , che tagliano il DNA all'interno delle loro sequenze di riconoscimento. La maggior parte riconoscono sequenze di DNA che sono **simmetriche**, perché si legano al DNA come omodimeri, **ma pochi**, (ad esempio, **Bbvcl**  $5' \dots \text{CCTCAGC} \dots 3'$   
 $3' \dots \text{GGAGTCG} \dots 5'$ ) può riconoscere sequenze di DNA **asimmetriche**, perché si legano come eterodimeri.

Alcuni enzimi riconoscono **sequenze continue** (ad esempio, **EcoRI = GAATTC**) in cui i **due semi-siti della sequenza di riconoscimento sono adiacenti**, mentre altri riconoscono **sequenze discontinue** (ad esempio, **BglI = GCCNNNNGGC**) in cui i **due semi-siti sono distanti**. Il taglio con l'enzima lascia un 3'-idrossile e un 5'-fosfato dall'altro su ciascun filamento di DNA. Essi richiedono solo magnesio per l'attività. **Essi tendono ad essere piccoli, con subunità di 200-350 acido amino.**

Il tipo di IIS sono quelli come **FokI**  $5' \dots \text{GGATG}(\text{N})_9 \nabla \dots 3'$   
 $3' \dots \text{CCTAC}(\text{N})_{13} \blacktriangle \dots 5'$  e **AlwI**  $5' \dots \text{GGATC}(\text{N})_4 \nabla \dots 3'$   
 $3' \dots \text{CCTAG}(\text{N})_5 \blacktriangle \dots 5'$  che **tagliano al di fuori della loro sequenza di riconoscimento e riconoscono sequenze che sono continue e asimmetriche**. Essi comprendono due domini distinti, uno legante del DNA, l'altro per la scissione del DNA. **Questi enzimi hanno una dimensione intermedia 400-650 amminoacidi.**

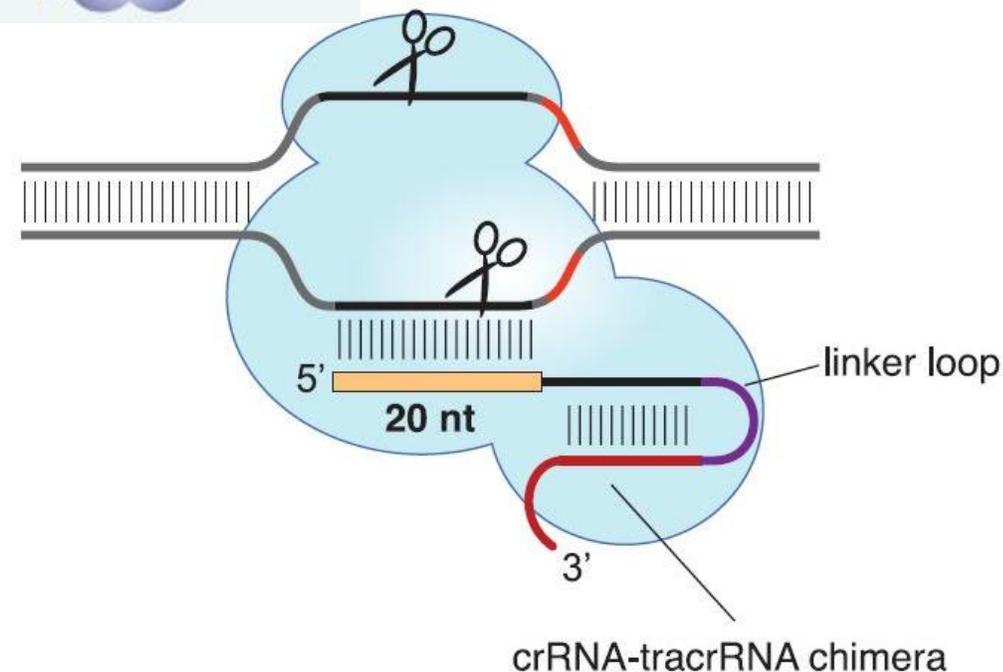
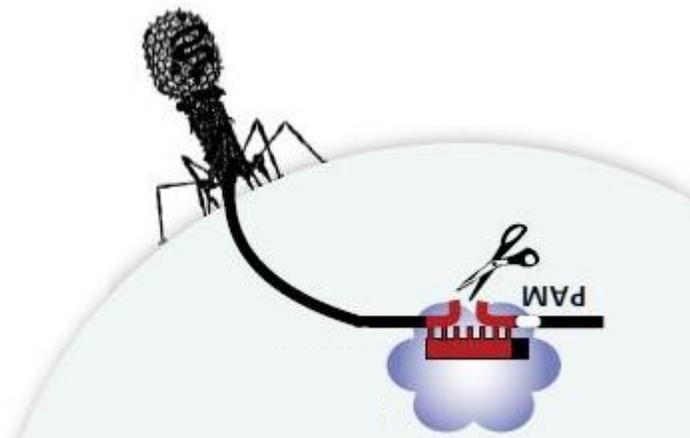
Il tipo IIG sono grandi **850-1250 amminoacidi**, una combinazione di enzimi di restrizione-e-modifica. **Questi enzimi tagliano fuori delle loro sequenze di riconoscimento e possono riconoscere sequenze continue** (ad esempio, **AcuI**  $5' \dots \text{CTGAAG}(\text{N})_{16} \nabla \dots 3'$   
 $3' \dots \text{GACTTC}(\text{N})_{14} \blacktriangle \dots 5'$ ) e tagliare su un solo lato; e quelli che riconoscono **sequenze discontinue** (ad esempio, **Bcgl**  $5' \dots \nabla_{10}(\text{N}) \text{CGA}(\text{N})_6 \text{TGC}(\text{N})_{12} \nabla \dots 3'$   
 $3' \dots \nabla_{12}(\text{N}) \text{GCT}(\text{N})_6 \text{ACG}(\text{N})_{10} \blacktriangle \dots 5'$ ) e legano su entrambi i lati rilasciando un piccolo frammento contenente la sequenza interna di riconoscimento.

## \*Enzimi di Restrizione di tipo V

### Enzimi di restrizione di Tipo V:

ad esempio cas9-gRNA del complesso **CRISPR** (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats) che utilizzano un RNA guida per indirizzare il complesso su specifiche sequenze complementari, non palindromiche e contenute nel DNA di organismi invasori.

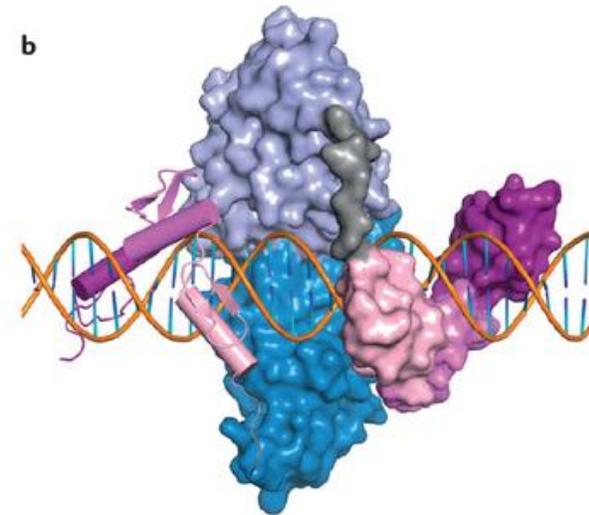
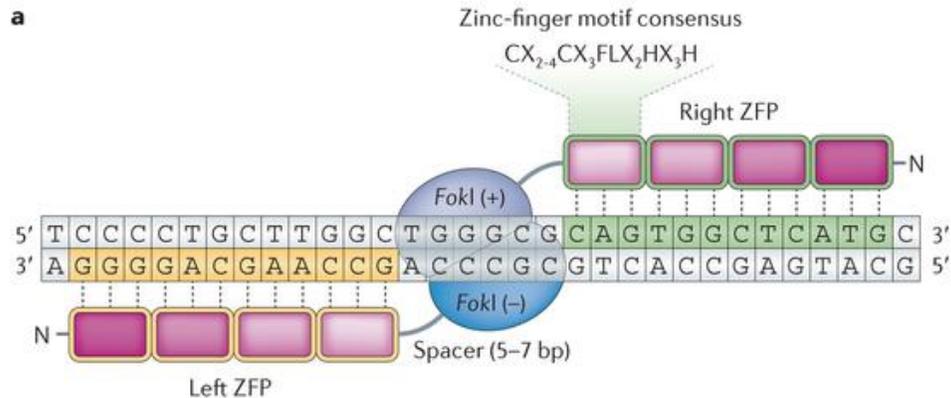
La flessibilità e facilità d'uso di questi enzimi li rendono molto promettenti per **applicazioni di ingegneria genetica e terapia genica**.



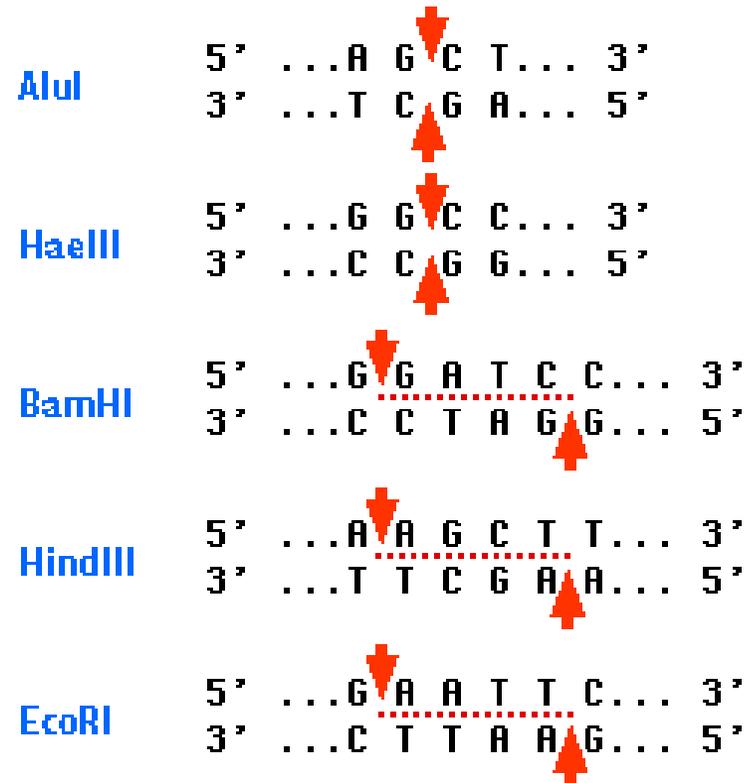
# Enzimi di restrizione artificiali

Enzimi di restrizione artificiali sono creati collegando il dominio di taglio del DNA dell'enzima FokI con altre proteine leganti il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche, come le **nucleasi a dita di zinco (ZFN)**: sono un potente strumento per l'*editing* del genoma. Le ZFN lavorano in coppia, e la loro dimerizzazione viene mediata *in situ* attraverso il dominio FokI. Ogni unità ZFN è in grado di riconoscere 9-12 coppie di basi, divenendo 18-24 per la coppia. Un distanziatore di 5-7 bp tra i siti di taglio migliora ulteriormente la specificità di ZFN.

Un recente studio clinico di sperimentazione di fase I utilizza ZFN per l'eliminazione mirata del gene per il co-recettore CCR5 di l'HIV-1.



# Enzimi di restrizione



**AluI** and **HaeIII** produce blunt ends

**BamHI** **HindIII** and **EcoRI** produce "sticky" ends

# Enzimi di restrizione

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		<p>5' overhang</p>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		<p>3' overhang</p>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		<p>Blunt ends</p>
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		<p>Blunt ends</p>
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		<p>5' overhang</p>

# Hind III



## Unit Definition:

**One unit** is defined as the amount of enzyme required to digest 1  $\mu$ g of  $\lambda$  DNA in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50  $\mu$ l.

## Reaction Conditions:

1X NEBuffer 2.1  
Incubate at 37°C

## 1X NEBuffer 2.1:

50 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100  $\mu$ g/ml BSA  
pH 7.9 @ 25°C

## Activity in NEBuffers

NEBuffer 1.1: 25%

**NEBuffer 2.1: 100%**

NEBuffer 3.1: 50%

CutSmart® Buffer: 50%

## Heat Inactivation:

80°C for 20 min

## Methylation Sensitivity:

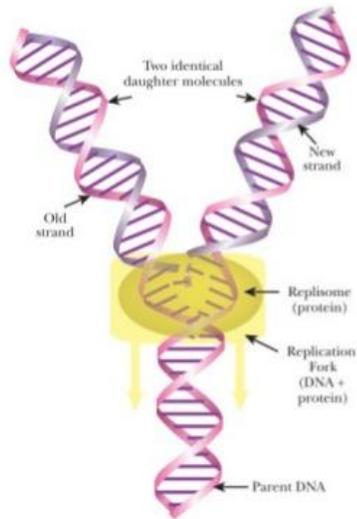
*dam* methylation: Not Sensitive

*dcm* methylation: Not Sensitive

CpG methylation: Not Sensitive

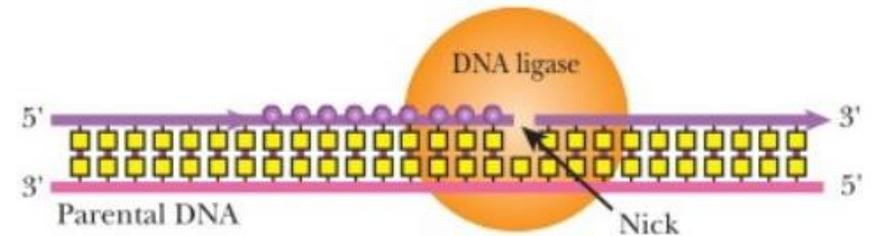
# Ligasi

## Enzymes and proteins in DNA replication

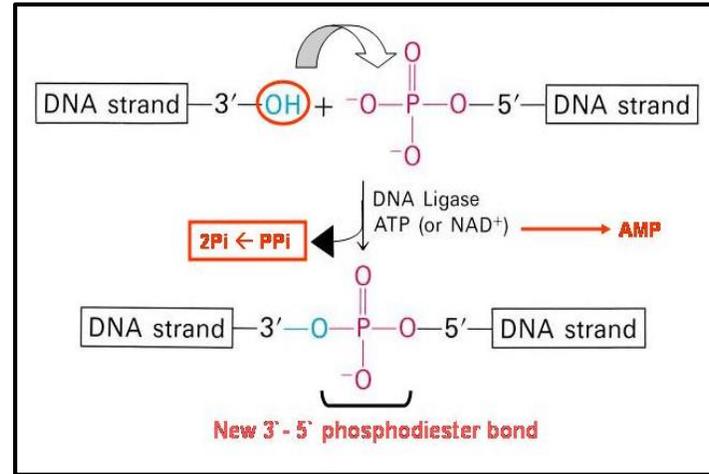
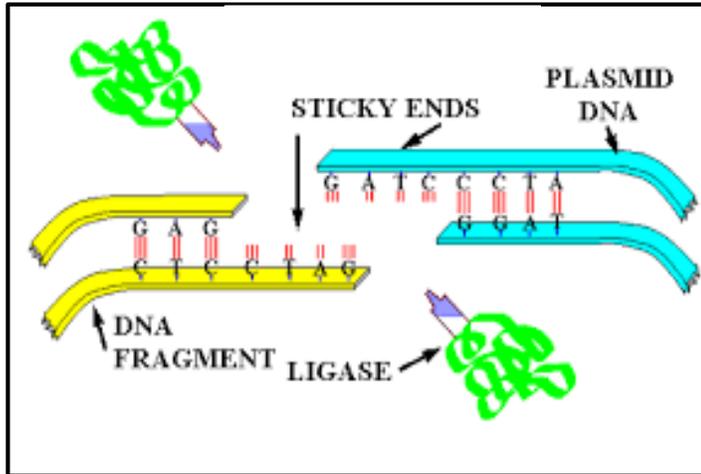


Presented by  
R.Parthasarathy

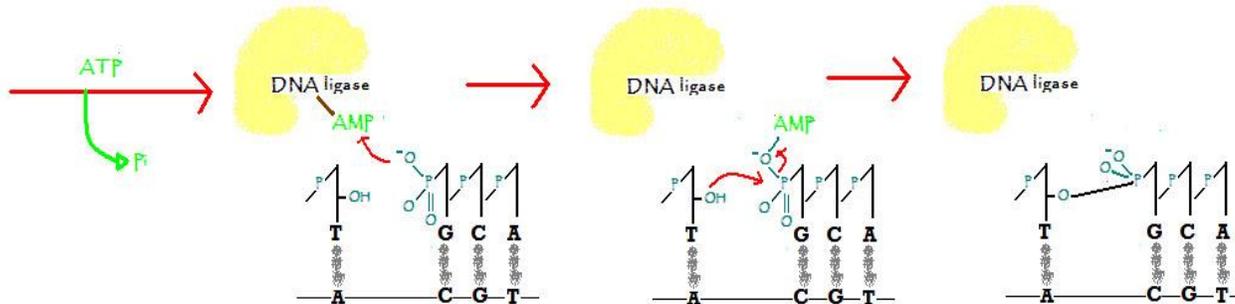
- DNA ligase seals the "nicks" between Okazaki fragments, converting them to a continuous strand of DNA.
- Covalently closes nicks in double-stranded DNA.



# Ligasi



ATP catalyzes the reaction for DNA ligase to repair/restore DNA or RNA strands.



La **Ligasi** è un tipo di enzima che può catalizzare il legame di due substrati mediante idrolisi. Ligasi possono usare come template sia molecole di DNA che RNA, due nucleotidi sono uniti formando legami fosfodiesterici covalenti tra 3'-OH di un'estremità di un nucleotide ed il 5'-fosfato di un'altra. **Il meccanismo di catalisi prevede tre passaggi:**

1. Il residuo di **lisina dell'enzima si lega covalentemente all'AMP dell'ATP** formando un **intermedio enzima-AMP**. La reazione è guidata dall'idrolisi dell'ATP in pirofosfato Pi.
1. **L'AMP viene trasferito al gruppo 5'-fosfato di un filamento di DNA.**
2. **Il 3'-OH dell'altro filamento di DNA tramite un attacco nucleofilo sull'atomo di fosforo spiazza l'AMP formando un legame fosfodiesterico.**

# Tipi di ligasi

- **DNA ligasi di *E. coli***: così come la maggior parte delle ligasi dei procarioti, **utilizza l'energia acquisita con il legame di una molecola di nicotinamide adenina dinucleotide (NAD) per creare il legame fosfodiesterico**. Non riesce a legare DNA blunt-end, se non in condizioni di concentrazione delle molecole in presenza di polietilene glicole, e non può unire efficientemente RNA a DNA.
- **T4 DNA ligasi**: la DNA ligasi dal batteriofago T4 è la ligasi più comunemente usata nei laboratori di ricerca. **Può legare estremità di frammenti di DNA *blunt* o *sticky*, oligonucleotidi, ma anche RNA e ibridi RNA-DNA, ma non acidi nucleici a singolo filamento**. Non può utilizzare NAD ma usa esclusivamente ATP come cofattore. **E' stata anche ingegnerizzata per migliorare l'attività *in vitro***: una T4 DNA ligasi è stata ottenuta dalla fusione con altre proteine, sia con p50 o NF-κB risultando oltre 160% più attiva della T4 DNA ligasi wild type e impiegata nel **clonaggio**.
- **Ligasi di mammifero**:
  - DNA ligasi I: lega il DNA nascente durante la duplicazione del filamento di DNA, dopo che la ribonucleasi H ha rimosso il primer di RNA dai **frammenti di Okazaki**.
  - DNA ligasi III: forma un **complesso di riparazione** del DNA con la proteina XRCC1. Tra tutte le ligasi dei mammiferi, solo Lig III è stata trovata nei mitocondri.
  - DNA ligasi II: sembra derivare dalla DNA ligasi III mediante un meccanismo **proteolitico**.
  - DNA ligasi IV: forma un complesso con XRCC4. E' coinvolta nei **processi che interessano la produzione delle regioni variabili nel DNA** coinvolte nella generazione della diversità delle immunoglobuline e del recettore delle cellule T durante lo sviluppo del sistema immunitario necessario per V (D) J ricombinazione.
  - DNA ligasi di eucarioti e alcuni microbi che utilizzano adenosina trifosfato (ATP) piuttosto che NAD.
- **Ligasi termostabili**. Presenti in vari **batteri termofili**, sono state clonate e sequenziate e disponibili in commercio.

# Applicazioni scientifiche di RE (e ligasi): il clonaggio

- RE sono utilizzati per aiutare l'inserimento di geni in vettori durante gli esperimenti di clonaggio genico per inserzione di frammenti di DNA o geni e la creazione di DNA ricombinanti. I plasmidi, ad esempio, comunemente utilizzati per il clonaggio genico sono modificati per poter includere una sequenza chiamata polylinker (**Multiple cloning site, MCS**) contenente sequenze riconosciute da una serie di enzimi di restrizione. Questo permette la flessibilità nella scelta dell'enzima più opportuno quando si inserisce un frammento di DNA in questo vettore, poiché i siti di restrizione contenuti naturalmente all'interno del gene da clonare influenzano la scelta dell'enzima utile per digerire sia l'inserto che il vettore. **Per clonare un frammento di gene in un vettore, sia il DNA plasmidico che l'inserto vengono tagliati solitamente con gli stessi enzimi di restrizione e poi «uniti» insieme mediante DNA ligasi.**

