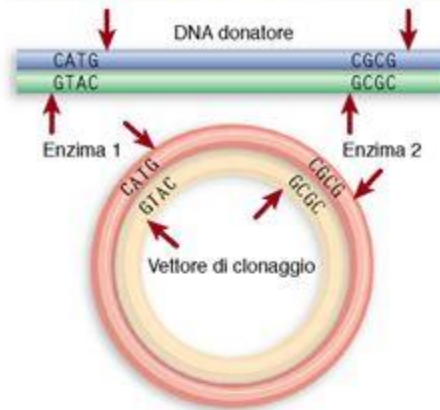


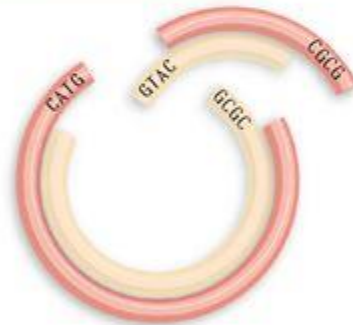
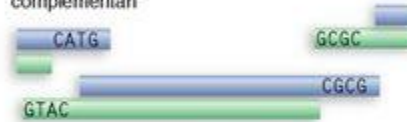
TAPPE CARATTERISTICHE DI UN CLONAGGIO

- **1- DIGESTIONE**
(Taglio del DNA da clonare e del vettore di clonaggio)
- **2- LIGAZIONE**
(Unione del DNA da clonare e del vettore di clonaggio)
- **3- TRASFORMAZIONE**
(inserimento clone in cellula ospite)
- **4- PIASTRAMENTO**
(replicazione dei cloni in terreno nutritivo)
- **5- SELEZIONE**
(riconoscimento dei ricombinanti).

Per clonare il DNA si usano enzimi di restrizione



I tagli generano sporgenze a filamento singolo complementari



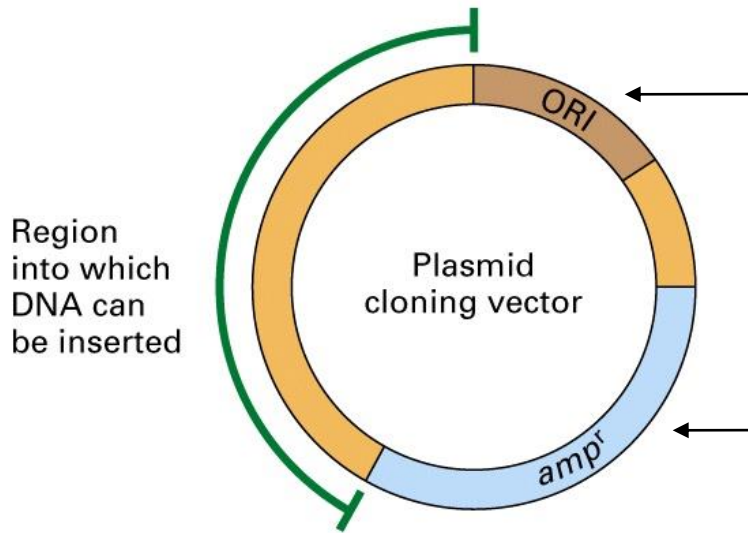
Il DNA donatore viene unito al DNA vettore



Elementi di un vettore plasmidico

1. Origine di replicazione
2. Marcatore di selezione
3. Sito di restrizione unico

Caratteristiche essenziali dei vettori plasmidici:



1) **Origine di replicazione in E. Coli**

2) **Marcatore di selezione che permette ai batteri trasformati di crescere su terreno selettivo**

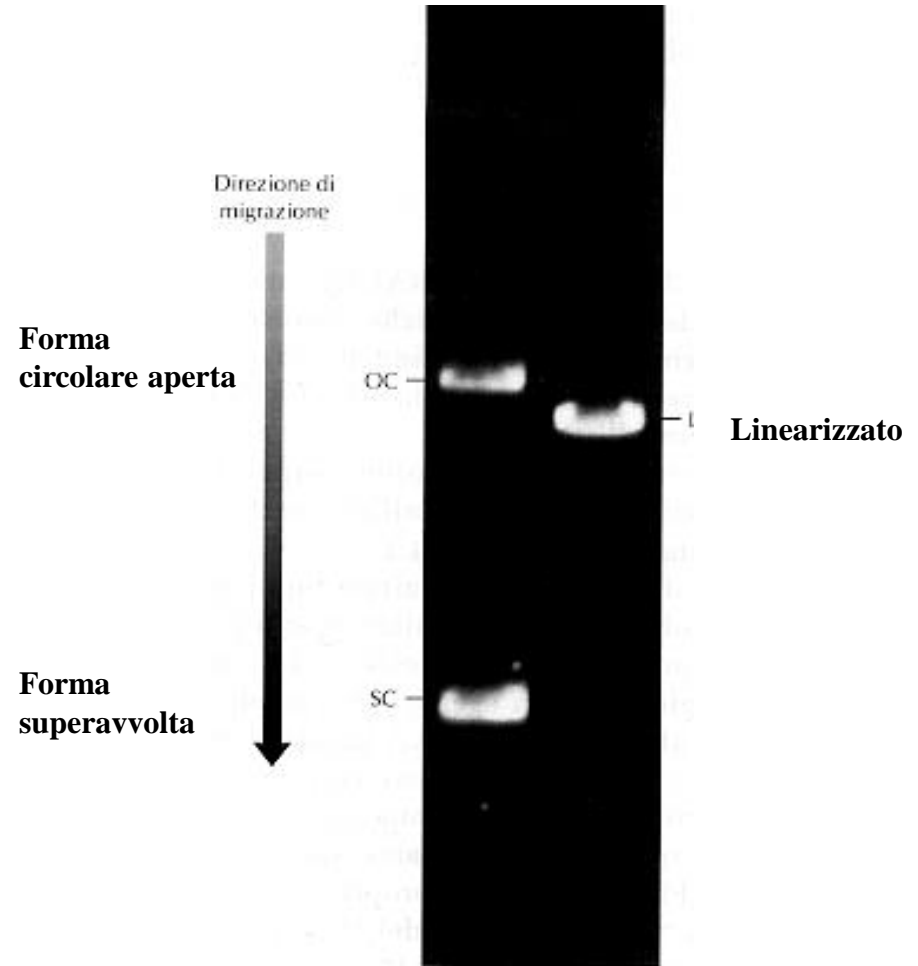
3) **Regione adatta ad inserire il DNA da clonare (sito multiplo di clonaggio o Multiple Cloning Site -MCS-, o poly-linker)**

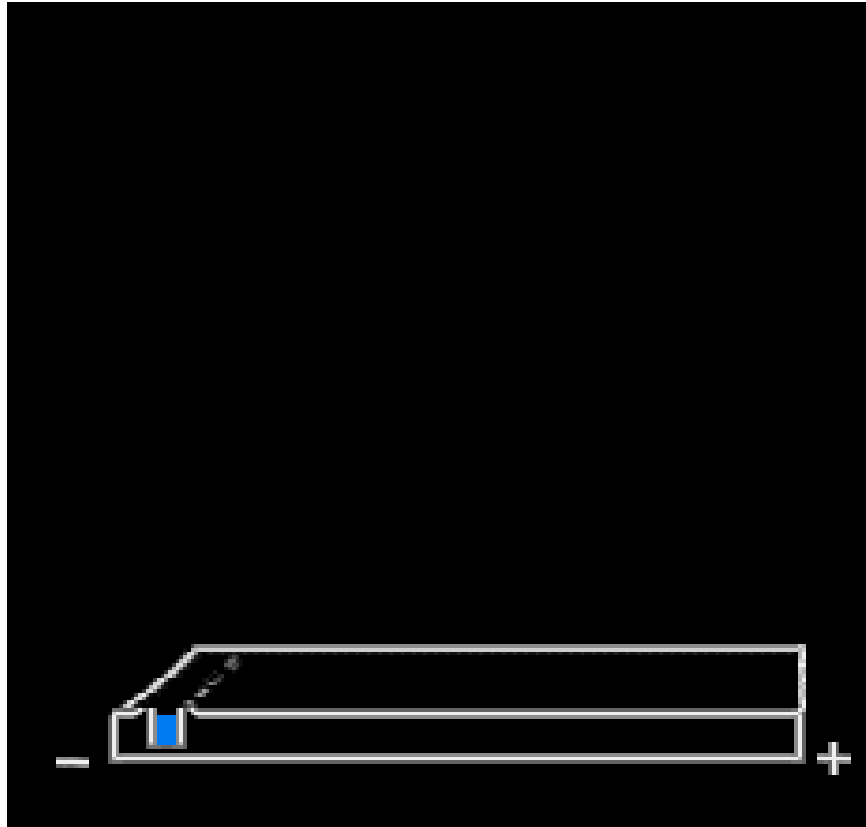
Plasmidi naturali

Molecole circolari di dsDNA (1.5-3000 kb),
extracromosomiali e capaci di autoreplicazione



Supercoiled Plasmid DNA





CLONAGGIO in PLASMIDE

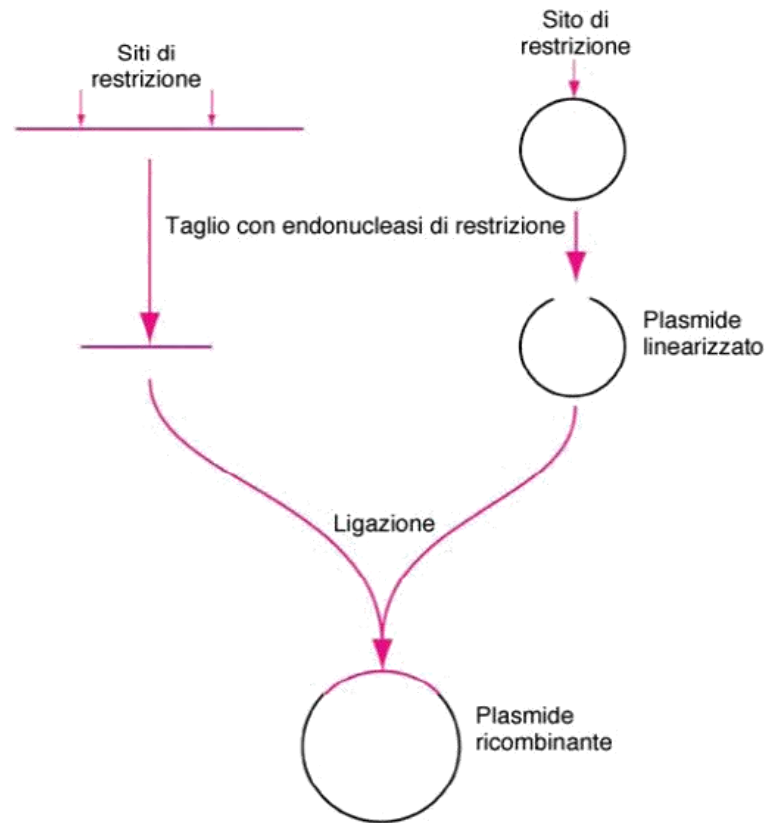


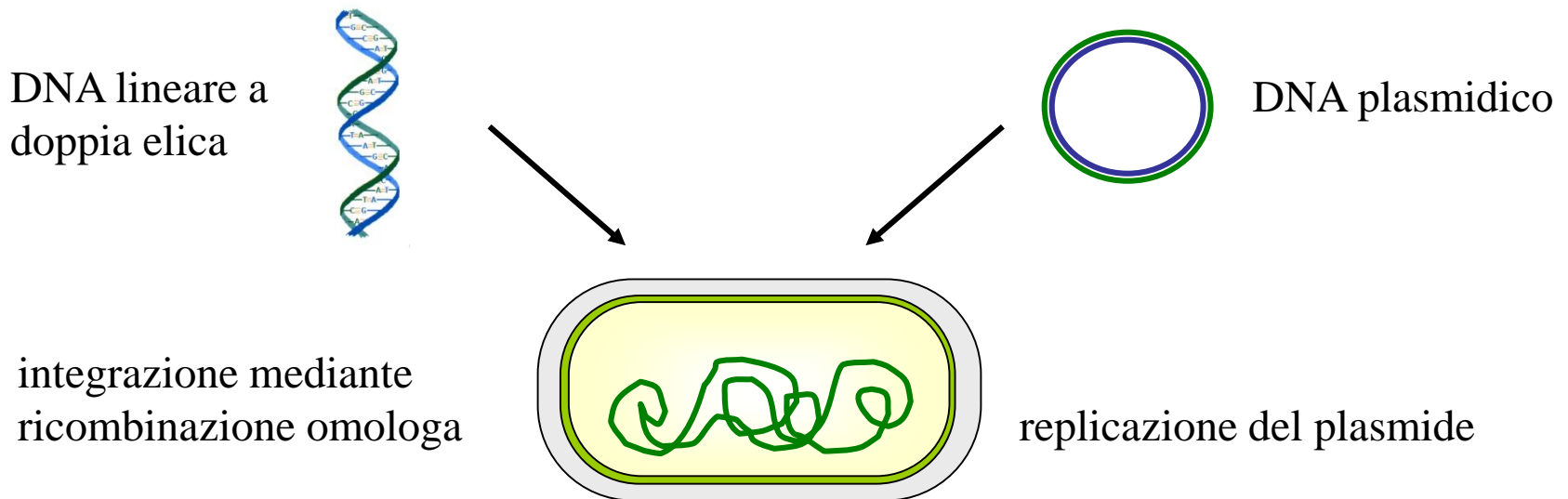
Figura 3.3 Taglio e unione del DNA

La trasformazione artificiale

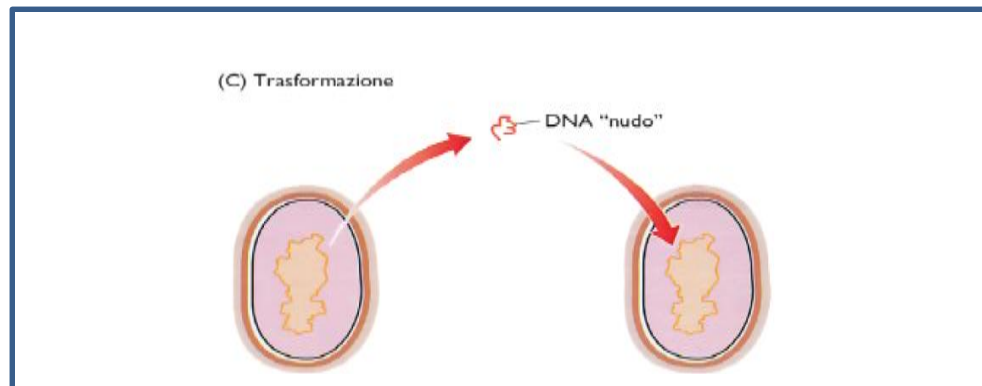
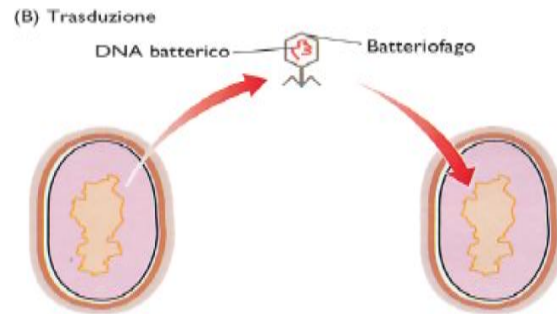
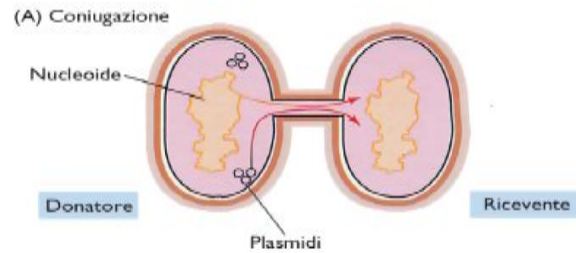
La maggior parte dei batteri possono essere trasformati artificialmente

Vengono utilizzati shock chimici e termici (CaCl_2)
o elettrici (elettroporazione)

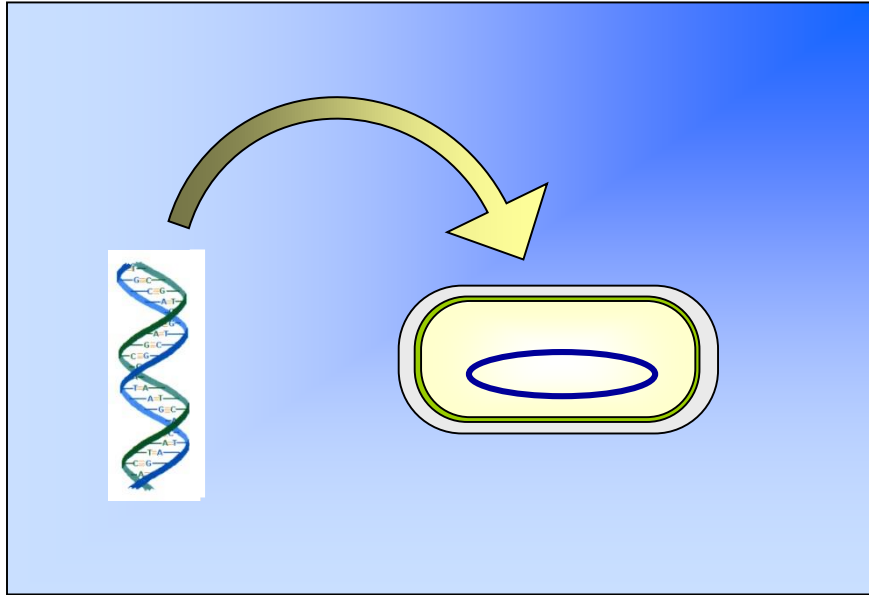
Il DNA viene introdotto integro nella cellula



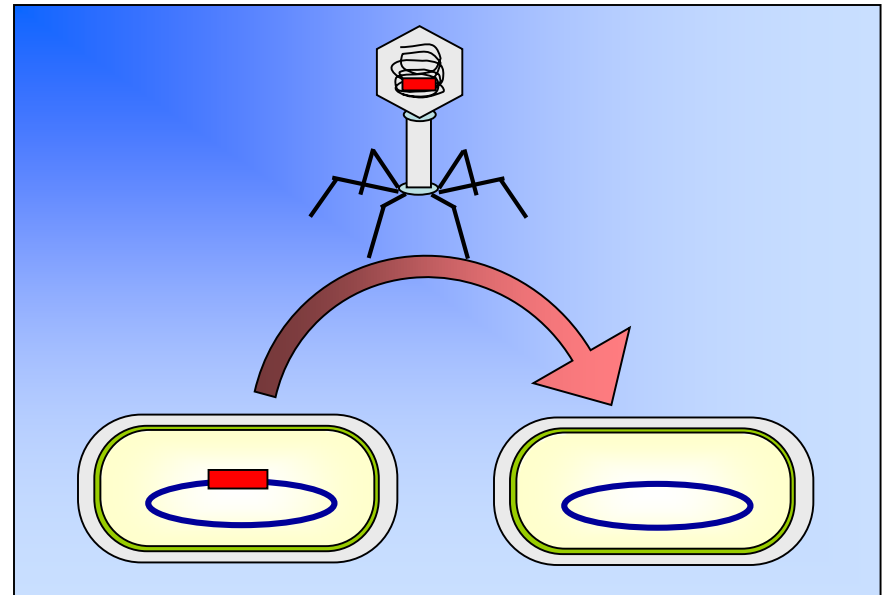
Con il termine trasformazione si intende l'inserimento di materiale genetico nei batteri, mentre con il termine trasduzione si intende il trasferimento di materiale genetico mediato da batteriofagi o virus.



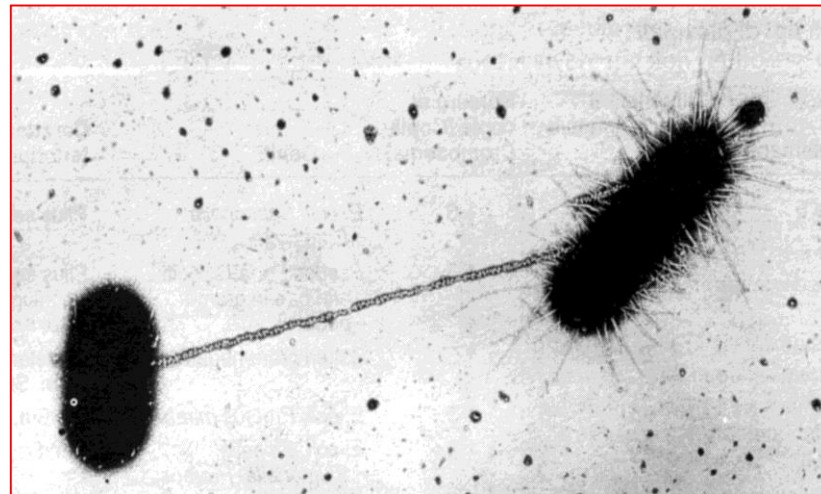
Trasformazione



Trasduzione



Coniugazione



TRASFORMAZIONE

**PROCESSO CON IL QUALE SI INTRODUCE DNA PURIFICATO
IN UNA CELLULA BATTERICA**

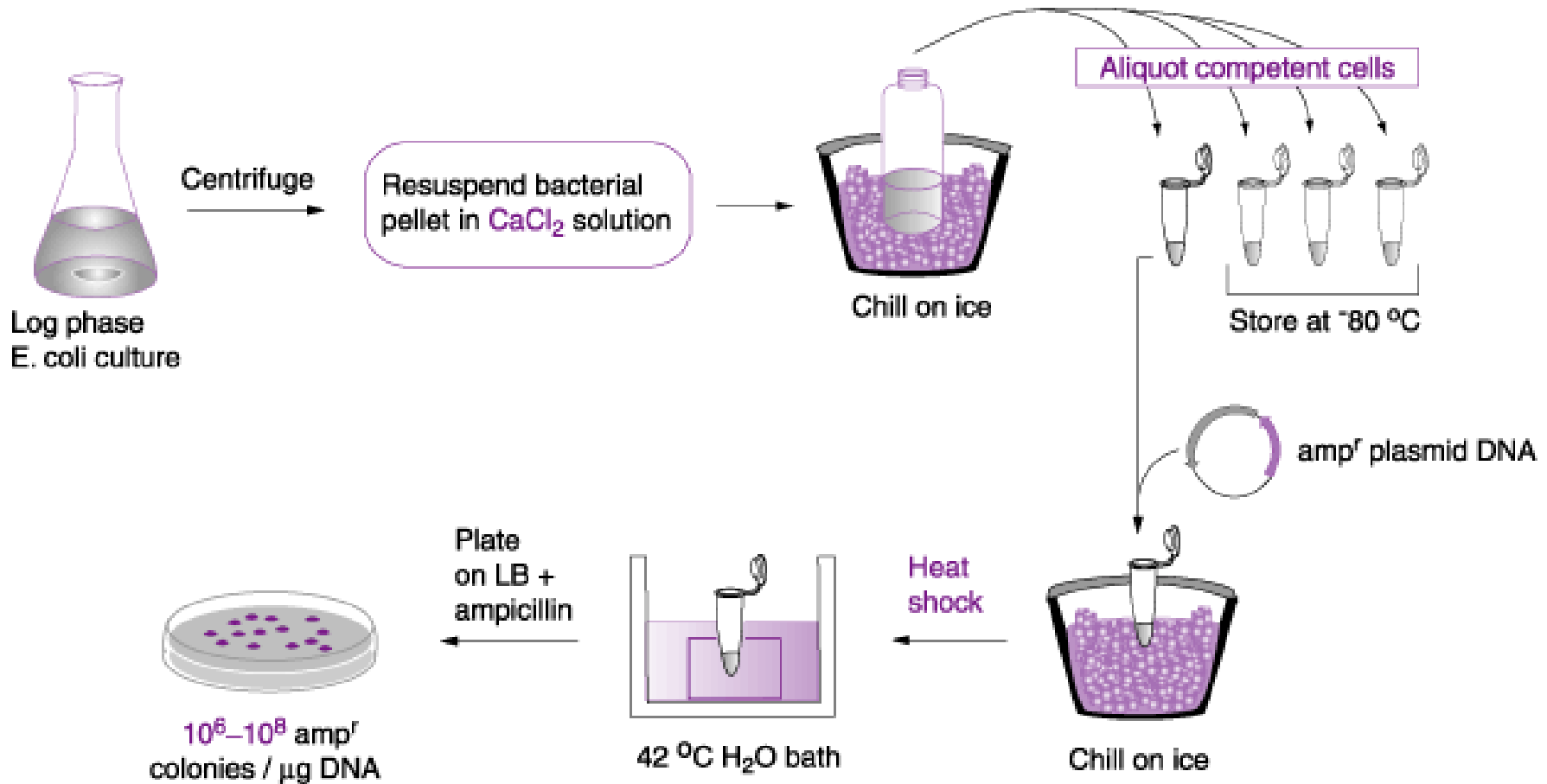
**TRATTAMENTO PRELIMINARE DI *E. coli* CON CLORURO DI CALCIO
(CaCl₂)**

CARATTERISTICHE DELLA CELLULA OSPITE:

- 1. PRIVE DI GENI PER GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE (Per evitare la degradazione del clone)**
- 2. NEGATIVE ALLA RICOMBINAZIONE (RecA-) (Per evitare che il DNA inserto venga alterato)**

Trasformazione in CaCl_2

Crescita di un ceppo E.Coli in terreno ricco di nutrienti.
Le cellule si raccolgono quando sono in fase logaritmica



Il DNA dei plasmidi è circolare.



Gene di resistenza all'ampicillina.



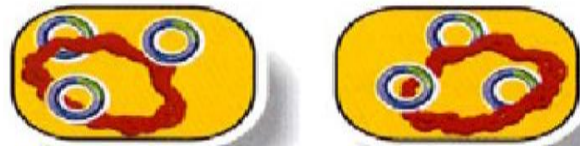
I batteri e i loro plasmidi si dividono in due ogni mezz'ora.



Il batterio prepara la propria divisione: duplica il suo cromosoma e il DNA dei plasmidi.



Scissione.



Si ottengono due batteri identici.

In 12 ore di coltura, un batterio dà origine a 168 milioni di batteri.

Resistenza agli antibiotici:



Solo i batteri che hanno integrato un plasmide codificante il gene per la resistenza possono crescere su agar nutritivo in presenza di antibiotico

Il clonaggio di un frammento di DNA richiede varie fasi

Scelta e preparazione del vettore

- Preparazione dei frammenti di DNA da clonare

Giunzione del DNA da clonare al vettore

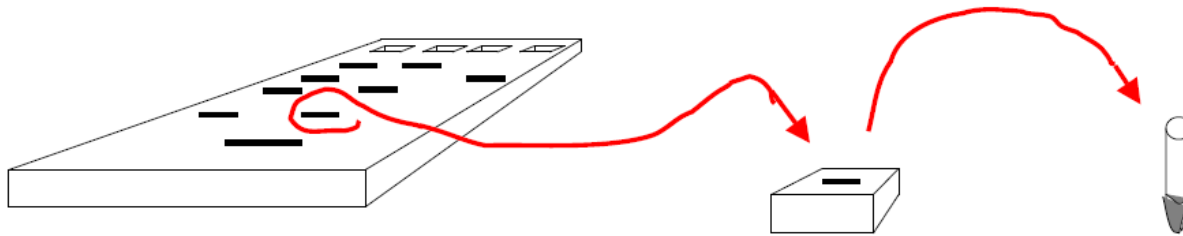
Introduzione nella cellula ospite

Selezione

Analisi dei prodotti

Estrazione di frammenti di DNA da gel

Dopo aver digerito un DNA con enzimi di restrizione ed averne separato i frammenti risultanti su gel di agarosio, il passo seguente di solito consiste nell'excidere dal gel, con un bisturi, specifiche bande corrispondenti a geni o porzioni di DNA di nostro interesse e purificarle da gel.

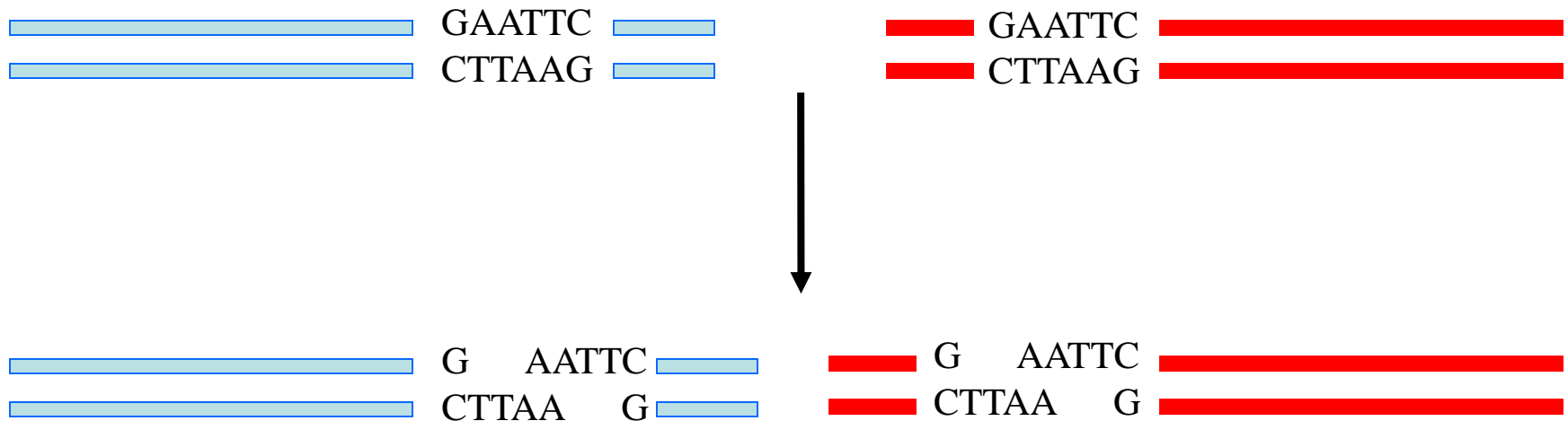


Esistono molti sistemi per purificare bande da gel, tra cui:

- elettroeluizione*
- colonne a scambio ionico*
- gel-filtration*
- agarosio a basso punto di fusione*

- **DNA RICOMBINANTE:** due tratti di DNA che in natura non sono adiacenti, vengono uniti in provetta.
- I due tratti da unire vengono tagliati con uno stesso enzima di restrizione.

EcoRI



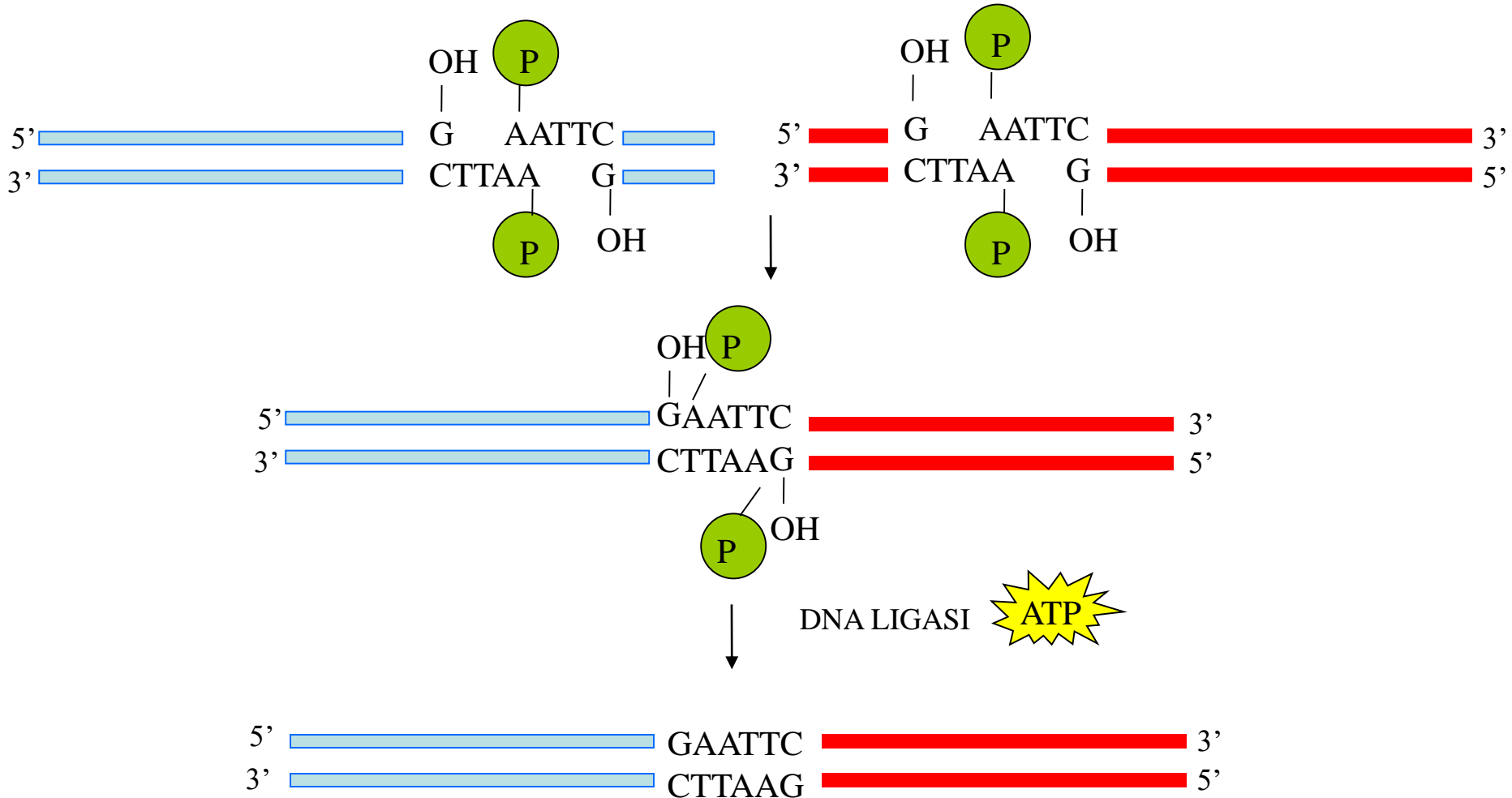
Le estremità coesive prodotte da uno stesso enzima possono appaiarsi.

————— G
————— CTTAA

AATTC —————
G —————

————— GAATTC —————
————— CTTAAG —————

Infine la DNA ligasi viene utilizzata per legare covalentemente le due molecole di DNA

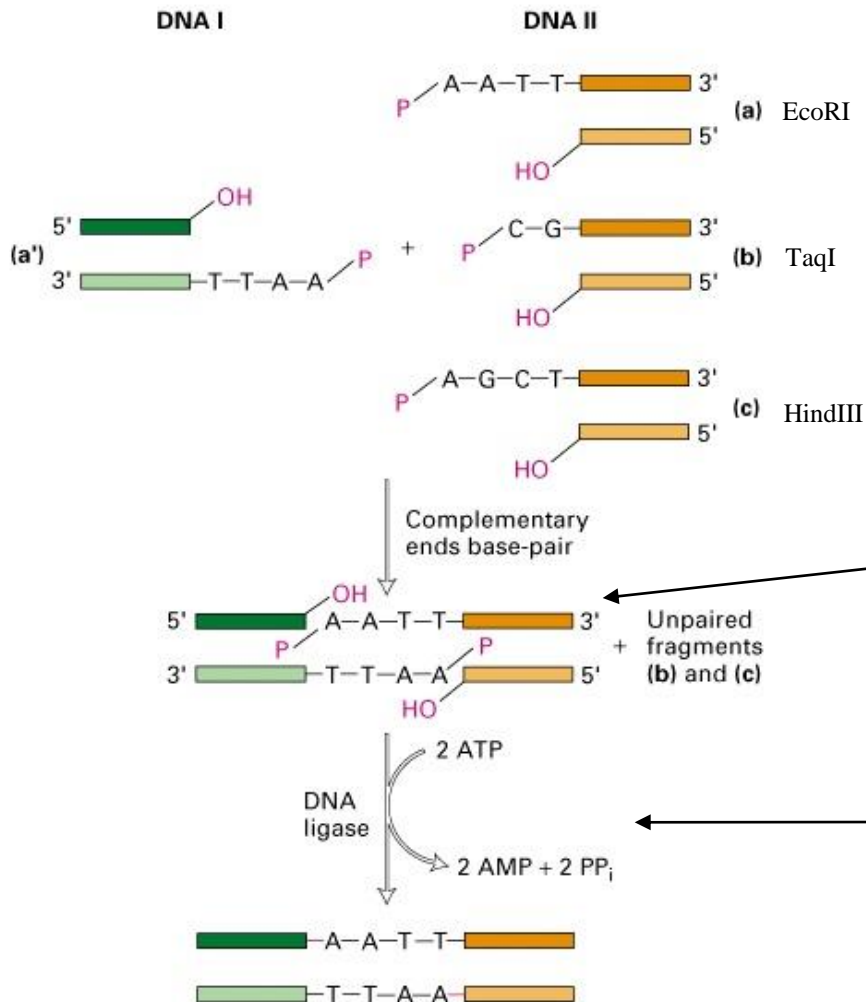


Ligazione

Dopo aver tagliato (e isolato) specifici frammenti di DNA, il passo successivo di un clonaggio consiste nel “cucirli” tra loro in modo covalente. Nella maggior parte dei casi questo compito è affidato alle ligasi, enzimi che catalizzano la formazione di legami fosfodiesterici tra estremità 3'-OH e 5'-P di molecole di DNA adiacenti, uguali (ligazione intra-molecolare) o diverse (ligazione inter-molecolare). Catalizzano, inoltre la chiusura di interruzioni a singolo filamento (nicks) in molecole di DNA a doppio filamento.

Il ruolo naturale della ligasi consiste nella riparazione dei nicks a singolo filamento di DNA danneggiati o nella giunzione dei frammenti di Okazaki durante la duplicazione del DNA. L'appaiamento di due frammenti di restrizione con estremità coesive è simile alla giunzione di due nicks, molto vicini, situati su filamenti opposti.

Solo frammenti con estremita' coesive compatibili possono essere facilmente legati covalentemente



Le estremita' coesive compatibili si appaiano, e i gruppi 3'-ossidrilico e 5'-fosfato di 2 frammenti appaiati che si trovano ad essere adiacenti ed allineati

La DNA ligasi (derivata dal batteriofago T4) catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico tra i gruppi 3'-ossidrilico e 5'-fosfato

La DNA ligasi più utilizzata è quella codificata dal batteriofago T4, un enzima, ATP-dipendente, ottenuto da cellule di *E. coli* infettate dal fago T4. Seppur a minor efficienza la T4 DNA ligasi è capace di ligare tra loro anche estremità piatte.

Questo enzima richiede **ATP** come substrato. Nel primo passaggio della reazione la ligasi reagisce con l'ATP per formare un complesso covalente ligasi-AMP, il quale, a sua volta, reagisce con il **fosfato al 5'** su un lato del nick, trasferendo l'AMP al gruppo fosfato. Il passaggio finale è l'attacco ad opera del gruppo 3'-OH che ripristina l'integrità dello scheletro zucchero-fosfato

Le estremità “coesive”, che contengono cioè corti filamenti a singolo filamento complementari tra loro, che vengono generate da molti enzimi di restrizione, facilitano il compito della ligasi, perché le estremità tendono ad appaiarsi tra loro.

Se, invece, bisogna ligare estremità “blunt”, la ligazione è più difficile e si effettua a bassa temperatura e a più elevata concentrazione di enzima e di frammenti da legare per favorire l'incontro delle molecole.

DNA ligasi

Temperatura ottimale teorica: 37°C. Esistono anche Ligasi termostabili che operano a 60°C.

Temperatura ottimale reale: 4°-16°C

Variazioni della concentrazione del DNA possono influenzare la reazione di ligasi:

- Bassa concentrazione di DNA favorisce le ri-circularizzazioni
- **Alta concentrazione di DNA favorisce il legame intermolecolare (inserto- vettore)**

La ligazione

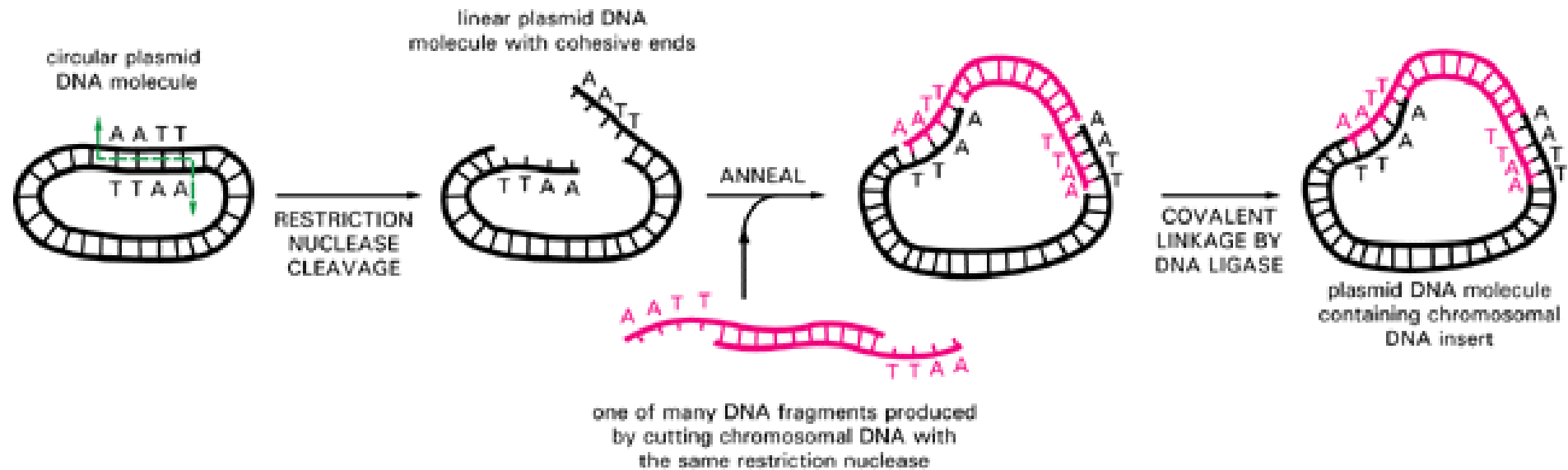
La ligazione va ottimizzata rispetto a:

- *temperatura e tempo di reazione*
- *concentrazione del DNA: totale, dell'inserto e del vettore.*

Temperatura: si contrappongono due aspetti opposti: la *stabilizzazione dell'appaiamento tra estremità coesive*, ottimale a basse temperature, e *l'attività enzimatica della ligasi*, massima a 37°C. Si utilizza spesso una temp. di 16°C per 12 ore.

Concentrazione: Basse concentrazioni di DNA totale favoriscono le *reazioni di primo ordine* (intramolecolare) come la *ricircularizzazione del vettore*. Aumentare la concentrazione totale incrementando la concentrazione di vettore, peggiora la situazione, ma aumentare la concentrazione dell'inserto aumenta la probabilità di avere vettori con inserti multipli.

Cosa può succedere in una reazione ligasica ?



1. Il vettore si richiude su sè stesso senza legarsi con l'inserto

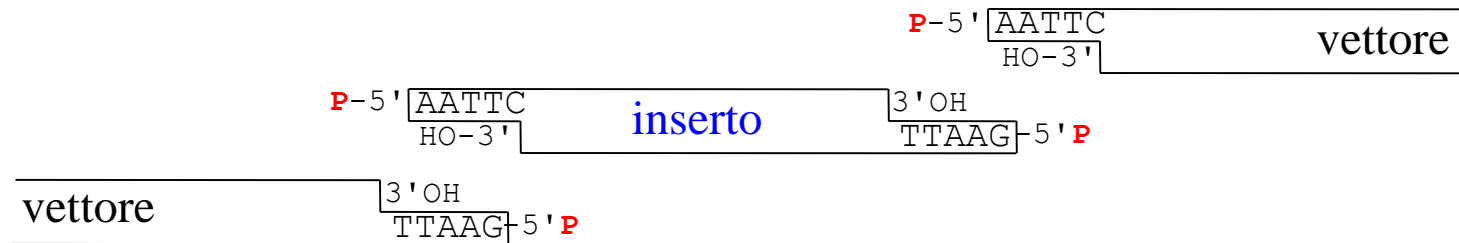
1. Il vettore si lega con l'inserto

La fosfatasi alcalina e la defosforilazione del vettore

- **Rimuove il fosfato alle estremità 5' del vettore**
- **Impedisce la richiusura DEL VETTORE SU SE STESSO**
- **Questo passaggio non occorre se le estremità prodotte per restrizione sono incompatibili**

Fosfatasi alcalina

In molti casi, pur ottimizzando la reazione di ligazione, non si riesce ad evitare una elevata frequenza di ricircularizzazione del vettore, come, ad esempio, quando il vettore e l'inserto sono tagliati con lo stesso enzima di restrizione.



Una strategia per superare questo problema consiste nell'utilizzo di una fosfatasi, come ad esempio la **fosfatasi alcalina** (CIP), un enzima che rimuove il gruppo fosfato al 5' impedendo così l'azione della ligasi. La defosforilazione del vettore con una fosfatasi impedisce la ricircularizzazione del vettore, abbassando sensibilmente il background. Poiché il vettore defosforilato non può essere ligato, è possibile utilizzare un eccesso molare di vettore, minimizzando la possibilità di avere inserzioni multiple.

In alcuni casi, per esempio nella costruzione di una libreria genomica, è più conveniente defosforilare l'inserto.

Estremità plasmide

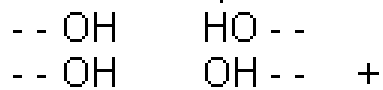


Con l'uso della fosfatasi alcalina:

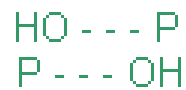


... ma con l'insero (che possiede i fosfati in 5'):

Estremità plasmide

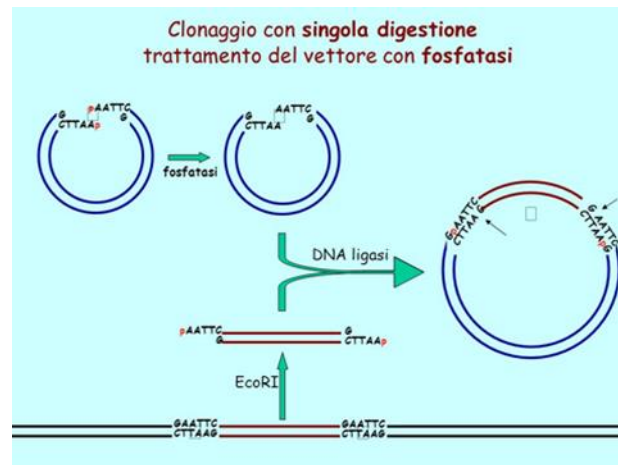
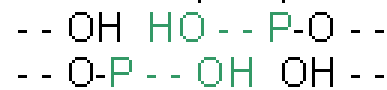


Insero



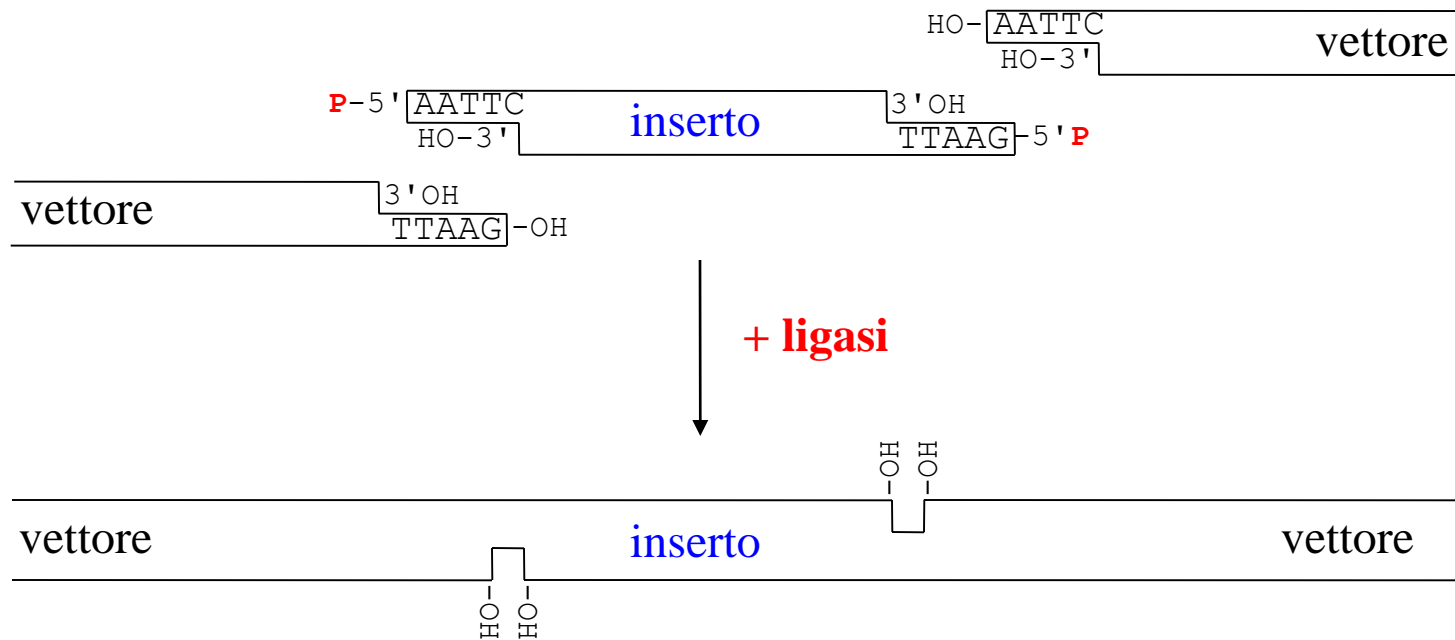
→ ligasi →

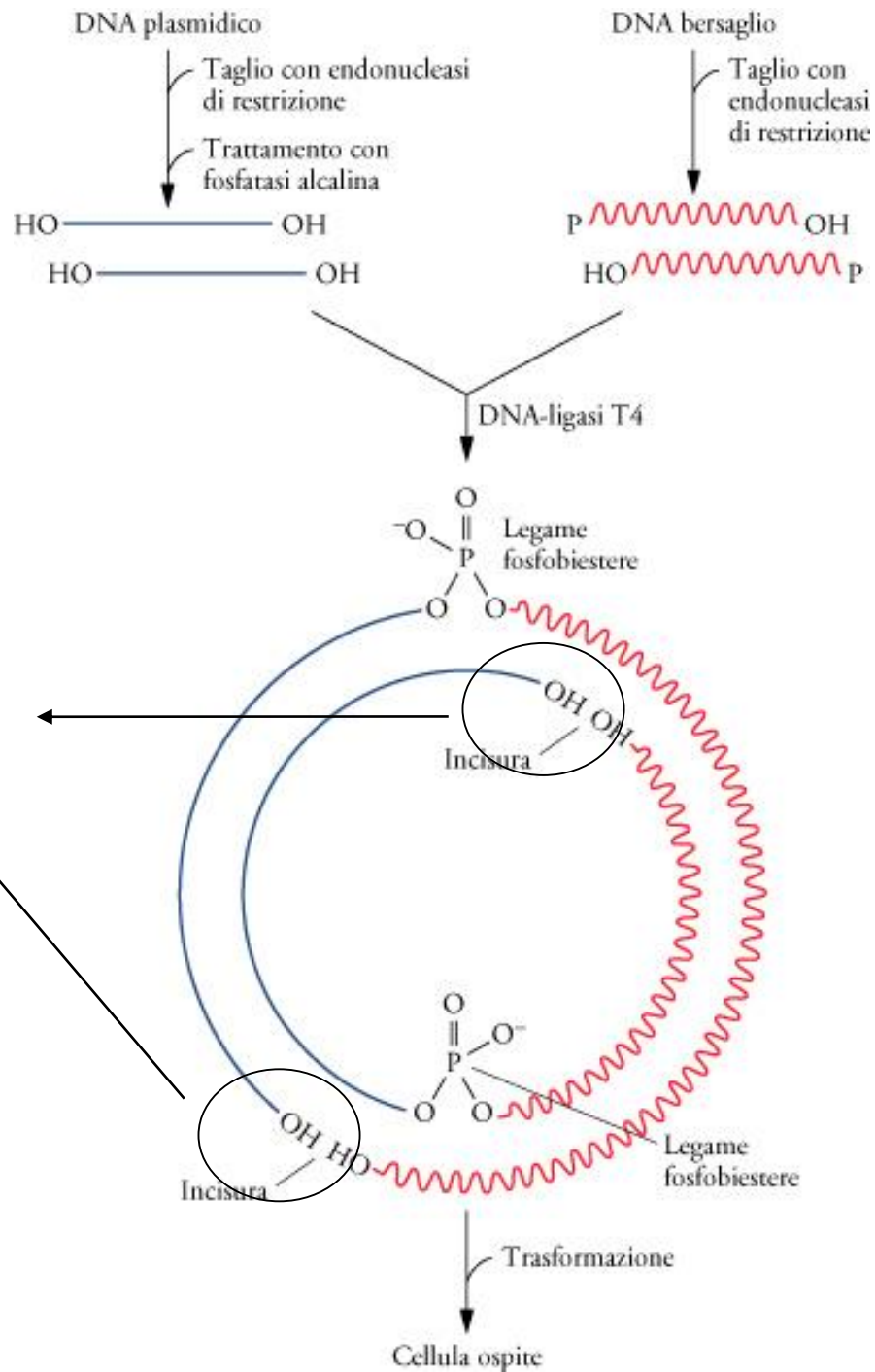
Presenza di nick, poi riparati dalla cellula trasformata



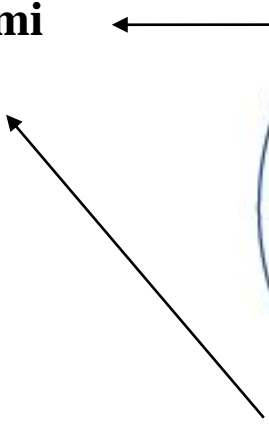


Un vettore defosforilato non può essere circularizzato dalla ligasi, può però essere ligato ad un inserto sfruttandone il suo fosfato al 5'. L'assenza di fosfati al 5' del vettore produrrà due nicks, uno per filamento. Queste interruzioni a singolo filamento, tuttavia non influenzeranno negativamente la stabilità del costrutto (vettore + inserto) e saranno riparate dai sistemi di riparo di *E.coli* subito dopo la trasformazione.





Riparate dagli enzimi della cellula ospite



ALCUNI ENZIMI PRODUCONO ESTREMITA' NETTE (BLUNT)



LE ESTREMITA' NETTE PRODOTTE DA UN ENZIMA POSSONO ESSERE LEGATE AD ALTRE ESTREMITA' NETTE PRODOTTE DA QUALSIASI ALTRO ENZIMA, SENZA LE LIMITAZIONI IMPOSTE DALLA COMPLEMENTARIETA' DELLE BASI DELLE CODINE APPICCICOSE.



SmaI



EcoRV



SVANTAGGI:

1) UNA LIGASI DI ESTREMITA' BLUNT E' MENO EFFICIENTE PERCHE' NON SI HA APPAIAMENTO TRA CODINE A SINGOLO FILAMENTO.

2) LA SEQUENZA IBRIDA CHE SI FORMA NON E' RICONOSCIUTA DA NESSUNO DEI DUE ENZIMI DI RESTRIZIONE.

Calcolo del rapporto Insetto (I)/Vettore (V) per il clonaggio

[DNA Tot] \geq 10-20 ng/ μ l

Rapporti molari I:V da 3:1 a 1:1

Vol. fin.= 10-20 μ l.

Calcolo delle moli di DNA: si considera il PM media o di una coppia di basi pari a 660 Dalton.

moli = g/ 660 x bp

Esempio : Vogliamo ligare 50 ng di un vettore di 10 Kb con un inserto di 1 Kb, in due separate reazioni, utilizzando due rapporti molari: I/V 1:1 e I/V 3:1.

Rapporto I/V = 1:1

50 ng/10 kb = x ng/1 kb

x ng = 50/10 x = 5ng

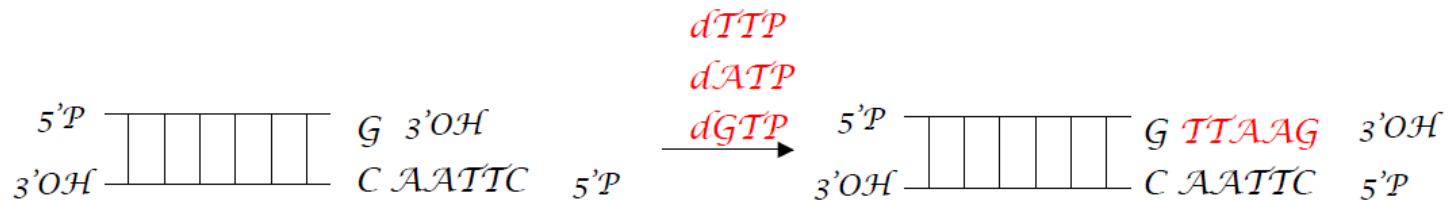
Rapporto I/V = 3:1 x = 15 ng

1° ESEMPIO

Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con estremità sticky 5' protruding (es. EcoRI)

FILLING IN

Consiste nel "riempire" un'estremità sporgente al 5' con la *Klenow*, una DNA polimerasi I modificata, in quanto priva dell'attività 5'-3' esonucleasica

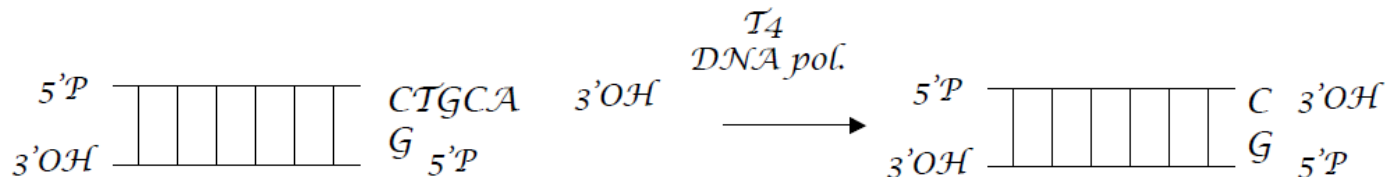


2° ESEMPIO

Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con estremità sticky 3' protruding (es. PstI)

TRIMMING

Non è possibile adoperare Klenow che, come tutte le polimerasi, sintetizza solo in direzione 5'-3'. Useremo, quindi l'attività 3'-5' esonucleasica di un enzima come la DNA polimerasi del fago T₄.



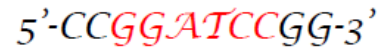
3° ESEMPIO

Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con estremità sticky (es. *Bam*HI), oppure con estremità blunt.

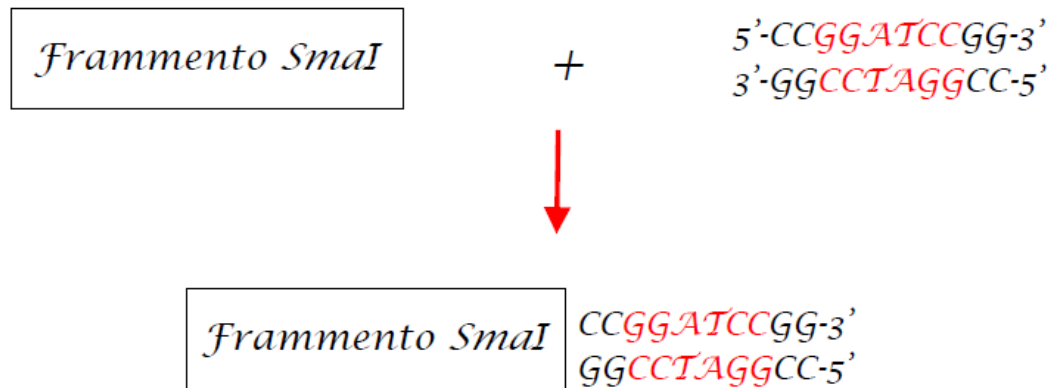
N.B. L'efficienza delle ligazioni "blunt" è abbastanza più bassa di quella di ligazioni con estremità sticky

LINKERS

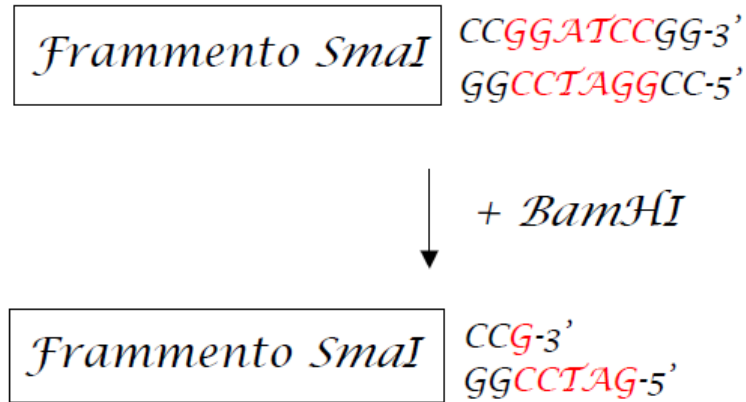
LINKER: sono corti oligonucleotidi sintetici *autocomplementari* che contengono, al loro interno, un sito di restrizione. Per esempio:



Che contiene al suo interno il sito di riconoscimento per *Bam*HI. Questo corto oligo ds va ligato con il frammento con blunt end



Trattando, quindi, con *Bam*HI avremo trasformato un'estremità blunt (*Sma*I) in una sticky (*Bam*HI).



Nonostante l'aggiunta di un linker implichi una ligazione blunt end, utilizzando elevate concentrazioni molari di linker, si migliora notevolmente l'efficienza di ligazione.

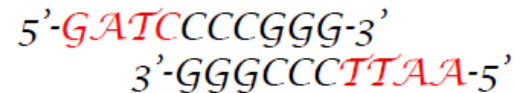
Gli eventuali multimeri di linker che si potrebbero così creare, saranno facilmente rimossi con la successiva digestione con l'enzima di restrizione.

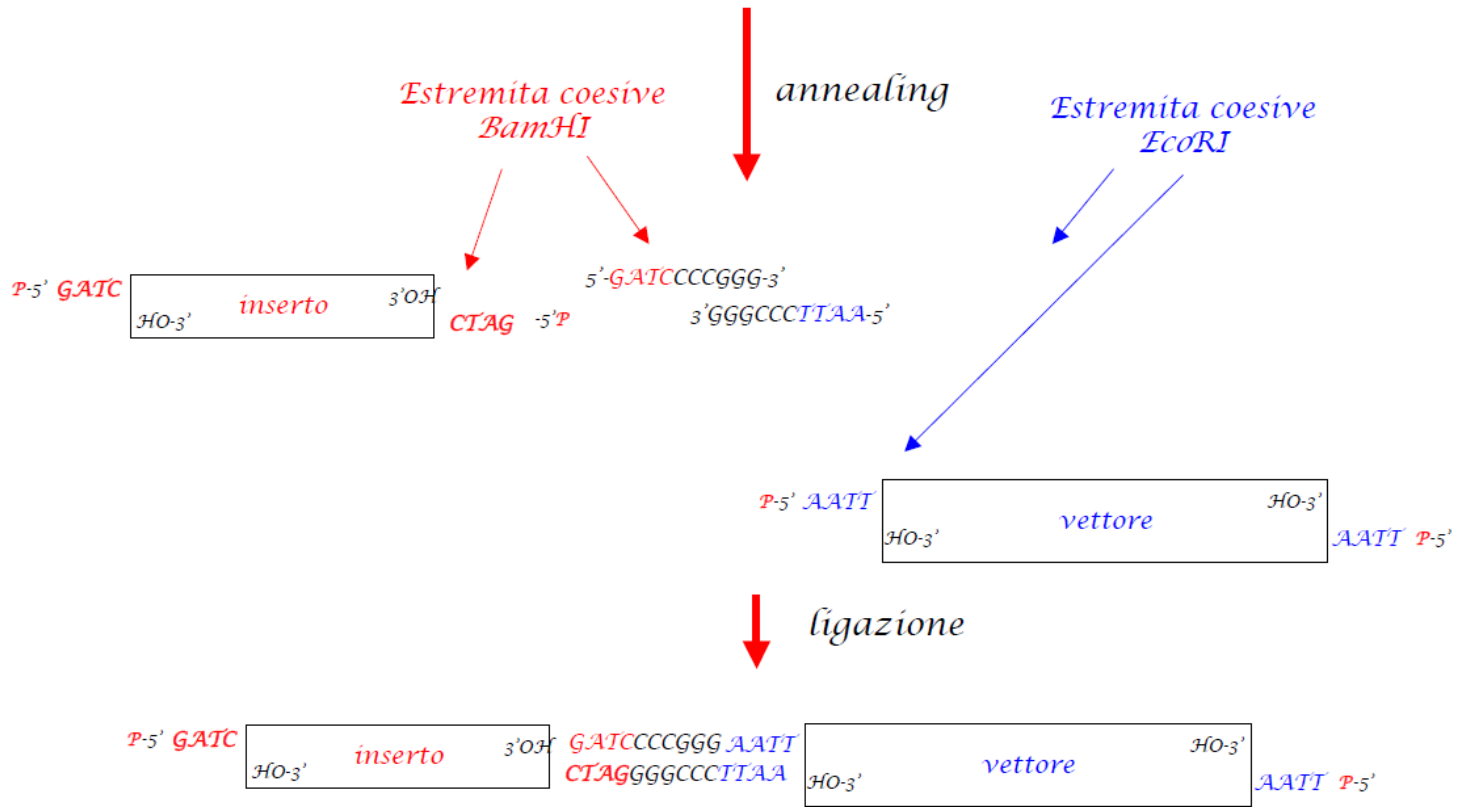
4° ESEMPIO

Clonaggio di un frammento con estremità sticky BamHI in un vettore con estremità sticky EcoRI.

ADAPTERS

coppie di brevi oligonucleotidi sintetici *parzialmente complementari* progettati per appaiarsi tra loro creando un frammento a doppia elica con estremità coesive differenti.



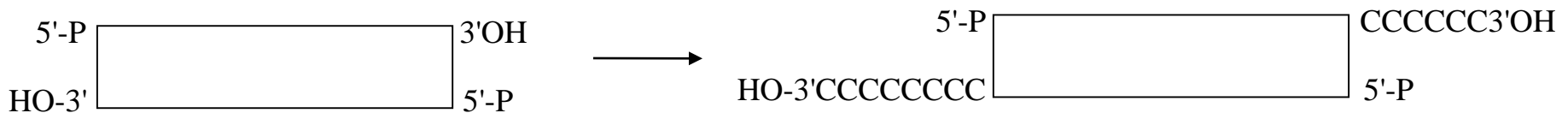


Omopolimeric tailing

Un'ulteriore strategia per aggiungere estremità coesive a molecole di DNA consiste nell'utilizzare la **terminal deossinucleotid transferasi**, più comunemente noto come terminal transferasi.

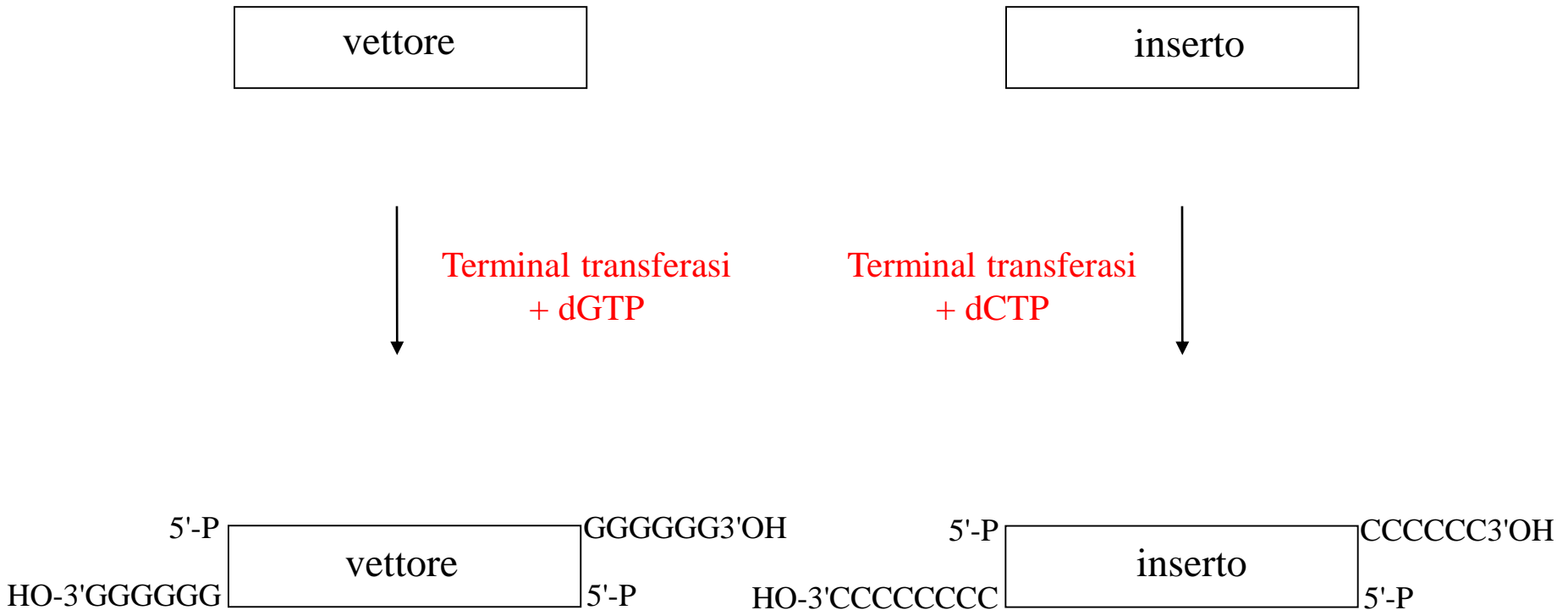
Questo enzima catalizza l'aggiunta, **stampo indipendente**, di nucleotidi trifosfati all'OH in posizione 3'.

Quando incubato in presenza di un singolo deossiribonucleotide trifosfato, per es: il dCTP, questo enzima catalizza l'aggiunta di una coda omopolimerica di questo deossiribonucleotide alla estremità 3' terminale.



Terminal transferasi + dCTP

Sottoponendo il vettore e l'inserto a trattamento con terminal transferasi con due deossiribonucleotidi diversi le due molecole diventano complementari tra loro e possono essere ligate.



CLONAGGIO:

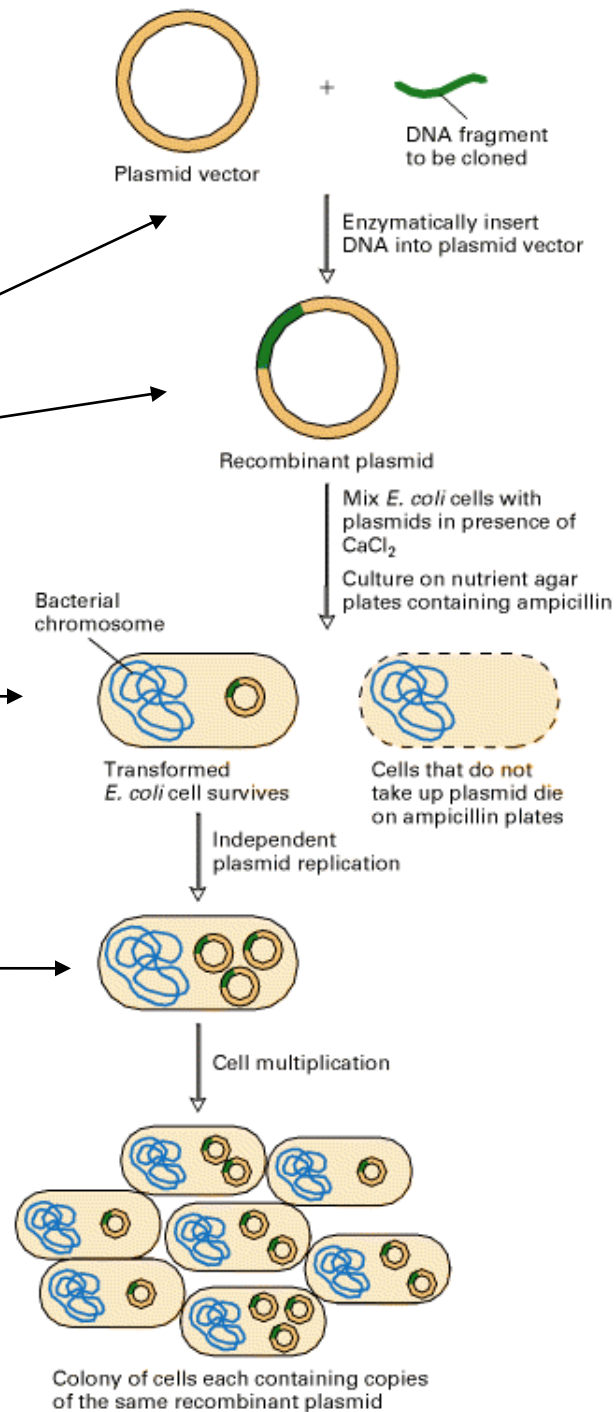
-PREPARAZIONE DI VETTORE E INSERTO

- LIGASI

- TRASFORMAZIONE

- SELEZIONE

- CRESCITA COLONIE

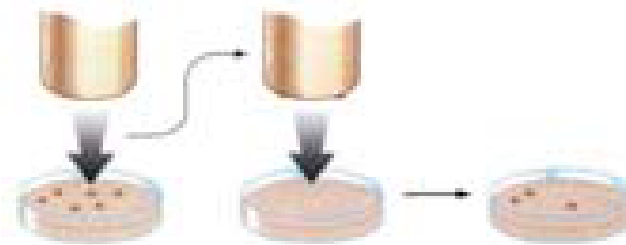
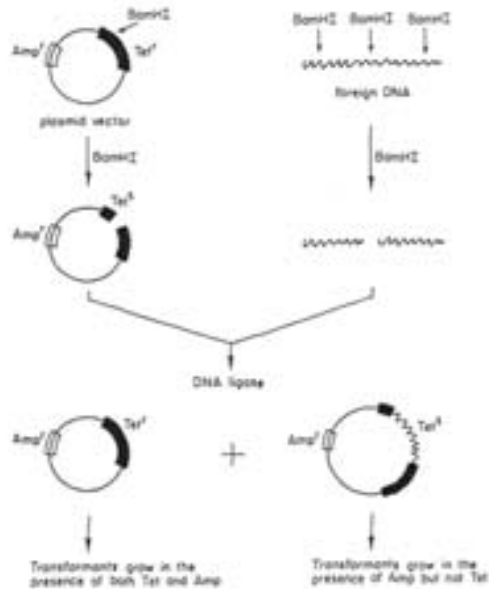


Inattivazione Inserzionale -marcatore *tet*-

Si taglia pBR322 ed il DNA bersaglio con l'enzima *Bam*HI. Al termine della ligazione si formano i soliti due prodotti:

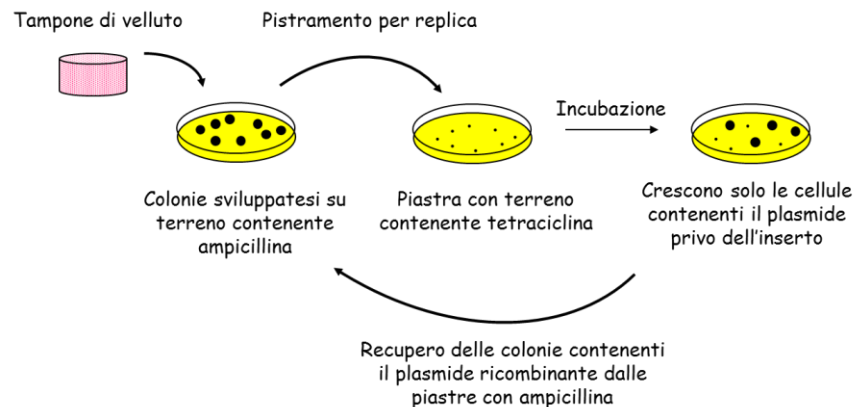
- pBR322 circularizzato cresce in ampicillina e tetraciclina
- pBR322 ricombinante cresce solo in ampicillina, perché l'inserzione del DNA bersaglio inattiva il gene *tet*

Le colonie di batteri che ospitano DNA ricombinante sono ampicillina-resistenti e tetraciclina-sensibili (*amp^R*, *tet^S*)



Ampicillina Tetraciclina Colonie su tetraciclina

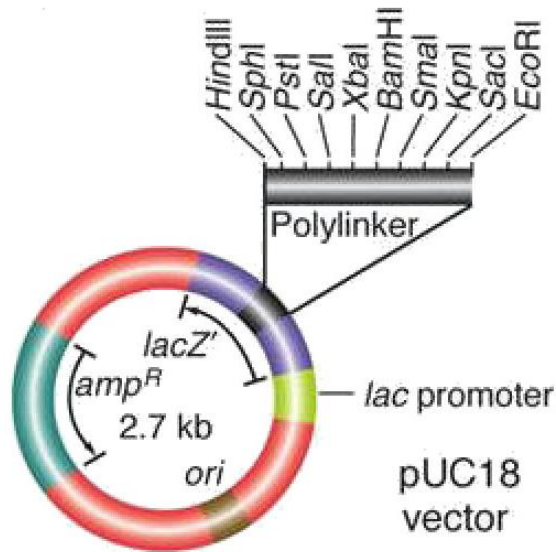
PIASTRAMENTO PER REPLICA



INATTIVAZIONE INSERZIONALE

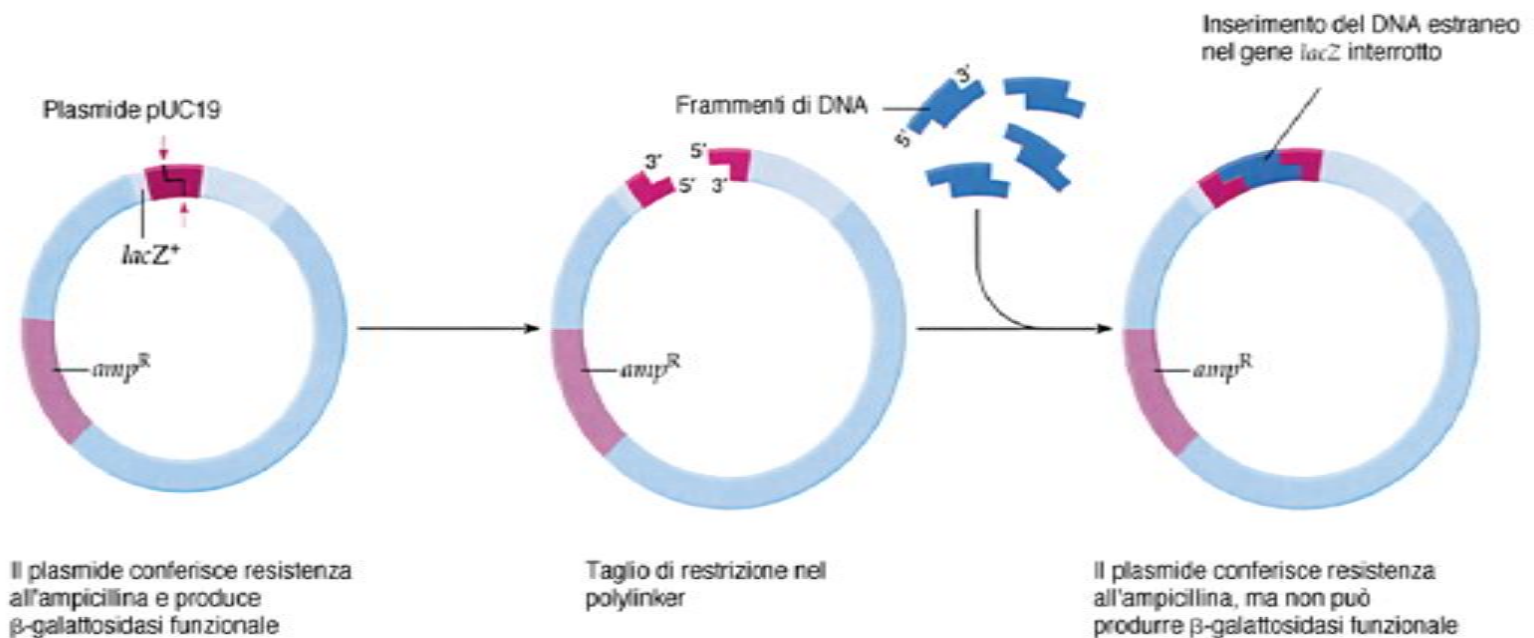
Sebbene lo schema di questi esperimenti rimanga concettualmente valido, questo tipo di selezione dei cloni ricombinanti non è più in uso, perché la selezione in due passaggi implica che bisogna attendere un giorno in più per conoscere i risultati finali della clonazione.

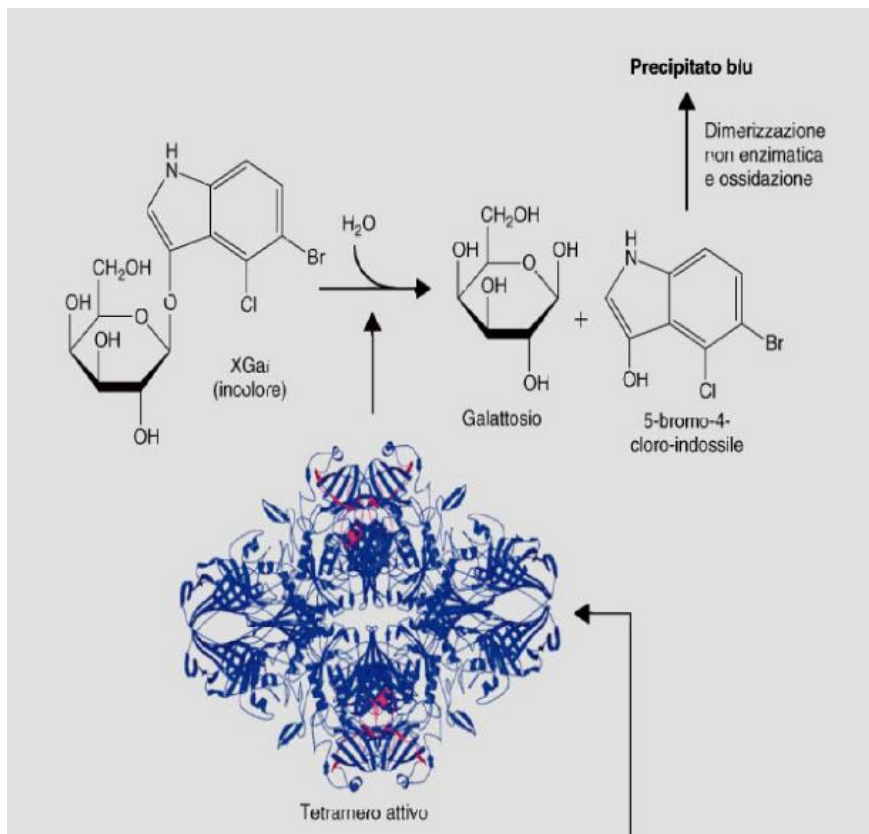
Caratteristiche di pUC 18



- Resistenza all'ampicillina (da pBR322)
- Replicone di pMB1 modificato per consentire la replicazione di un alto numero di copie per cellula (500-700)
- Elementi di controllo di *lac* (Plac)
- Gene *lacZ'*, codificante per un α -peptide funzionale della β -galattosidasi
- Sito di policlونaggio, fiancheggiato da sequenze per l'appaiamento dei primer universali “forward” e “reverse”

Inserzione di un frammento di DNA nel vettore plasmidico pUC19, per produrre una molecola di DNA ricombinante. pUC19 contiene molti siti di restrizione unici localizzati in un polylinker, che servono per la costruzione di molecole di DNA ricombinante. L'inserzione di un frammento di DNA nel polylinker interrompe parte del gene per la β -galattosidasi (*lacZ'*), rendendo non funzionale l'enzima in *E. coli*. La selezione per il colore bianco-blu descritta nel testo serve per distinguere i vettori contenenti o meno l'inserto.



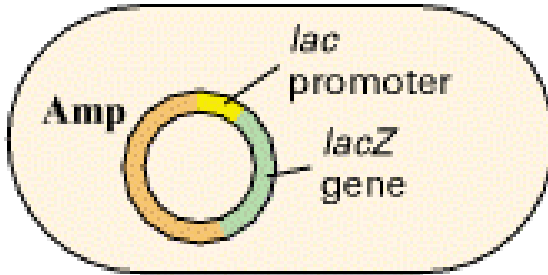


La β -gal funzionale in presenza dell'induttore IPTG, è in grado di idrolizzare un substrato cromogenico chiamato X-gal in galattosio e in 5-bromo-4-cloroindossile. Quest'ultimo dimerizza spontaneamente e produce un colorante blu insolubile (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo)

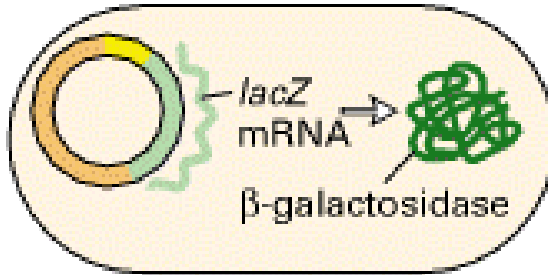
β -galattosidasi

X gal: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -galattoside
IPTG: isopropiltio- β -D-galattoside

L'enzima beta-galattosidasi può essere utilizzato per discriminare le colonie che contengono un plasmide con inserto da quelle che contengono un plasmide senza inserto

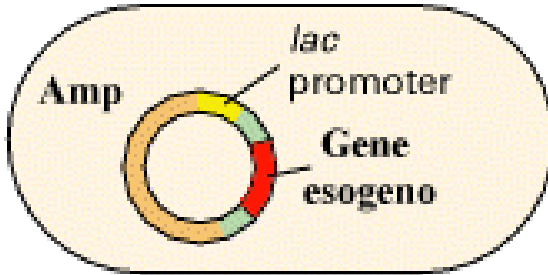


- IPTG

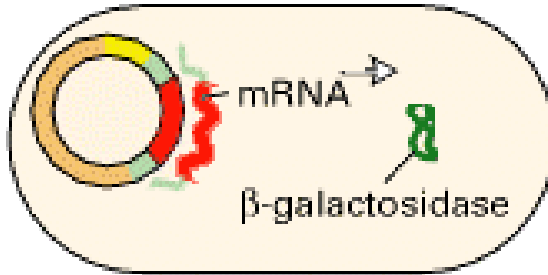


+ IPTG

**Colonia Amp resistente
blu**

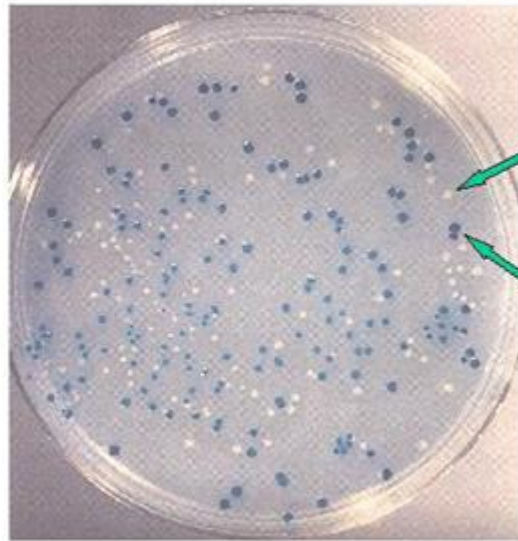


- IPTG



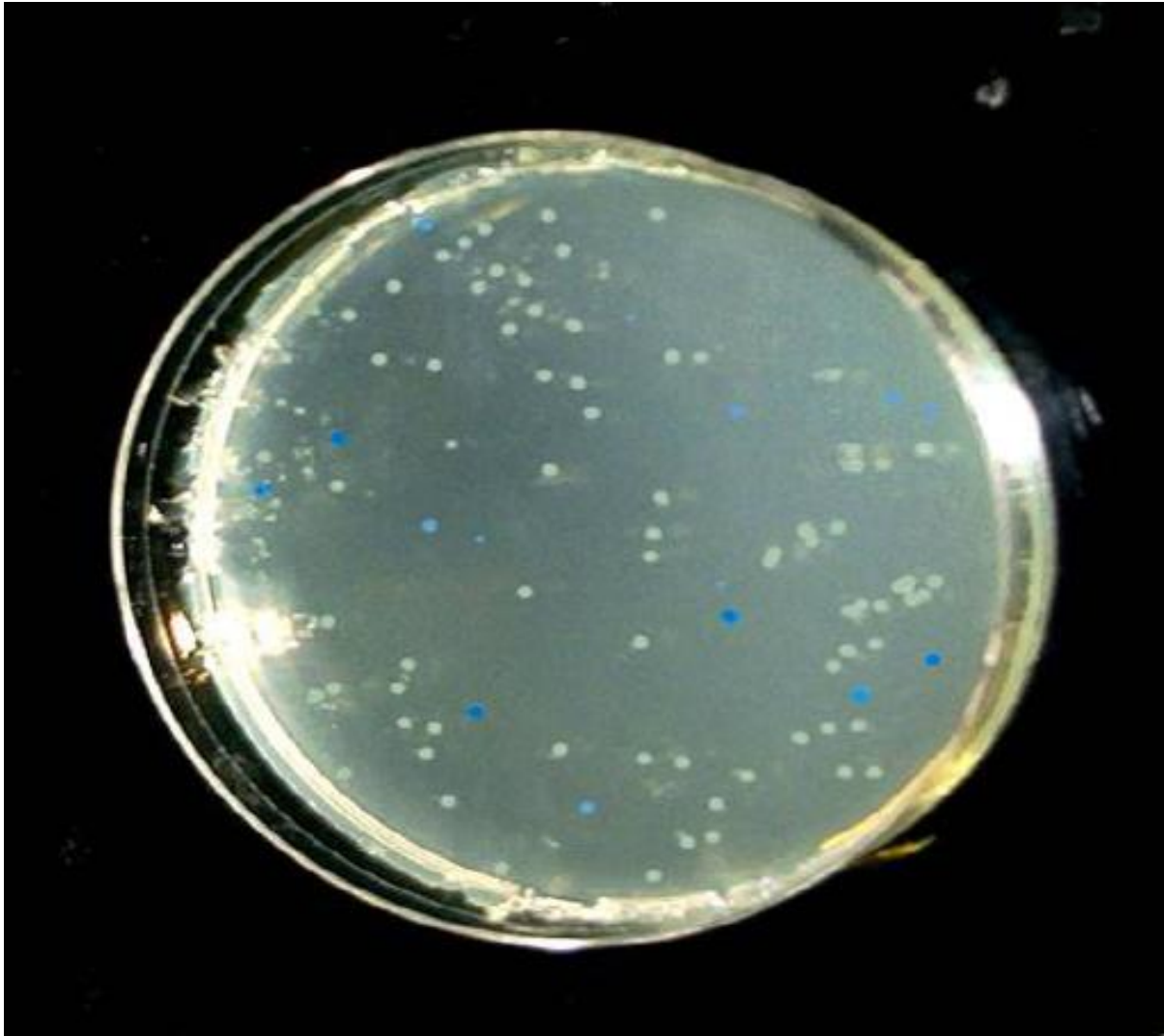
+ IPTG

**Colonia Amp resistente
bianca**



Colony with insert

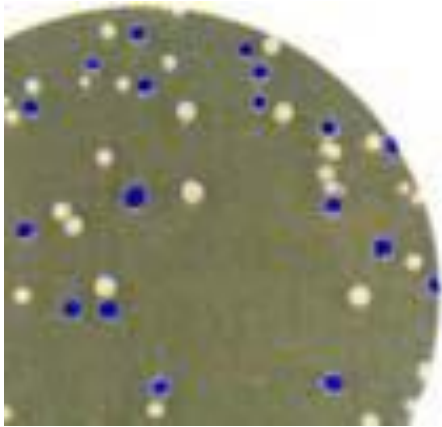
Colony with no insert



Saggio di α -complementazione (bianco-blu)

Se si fornisce un substrato cromogeno (**X-gal**), l'idrolisi del substrato da parte dell'enzima β -galattosidasi dà luogo a molecole che si colorano di blu dopo esposizione all'aria:

- Se avviene α -complementazione le cellule si colorano di blu (plasmidi non ricombinanti).
- Se non avviene α -complementazione le cellule restano bianche (plasmidi ricombinanti: l'inserzione di DNA ha reso il peptide α non funzionale).



Bisogna tuttavia notare che:

- Il saggio può dare un certo numero di falsi negativi, cioè colonie blu che in realtà sono ricombinanti.

Questo si verifica spesso con inserti piccoli di DNA (<500 bp)

- Il saggio può dare falsi positivi, cioè colonie bianche che in realtà non sono ricombinanti.

Questo si può verificare se il ceppo accumula mutazioni nei geni lacZ, oppure pur portando l'inserto da clonare questo non altera la cornice di lettura (ad es. perché è molto piccolo).

Limiti del clonaggio in vettori plasmidici

- Bassa efficienza di trasformazione e bassa densita' a cui si possono crescere le colonie
- limitata capacita' di contenuto (5-10 kb)

- uso di vettori derivati dal batteriofago λ , particolarmente per l'analisi di librerie genomiche o di cDNA