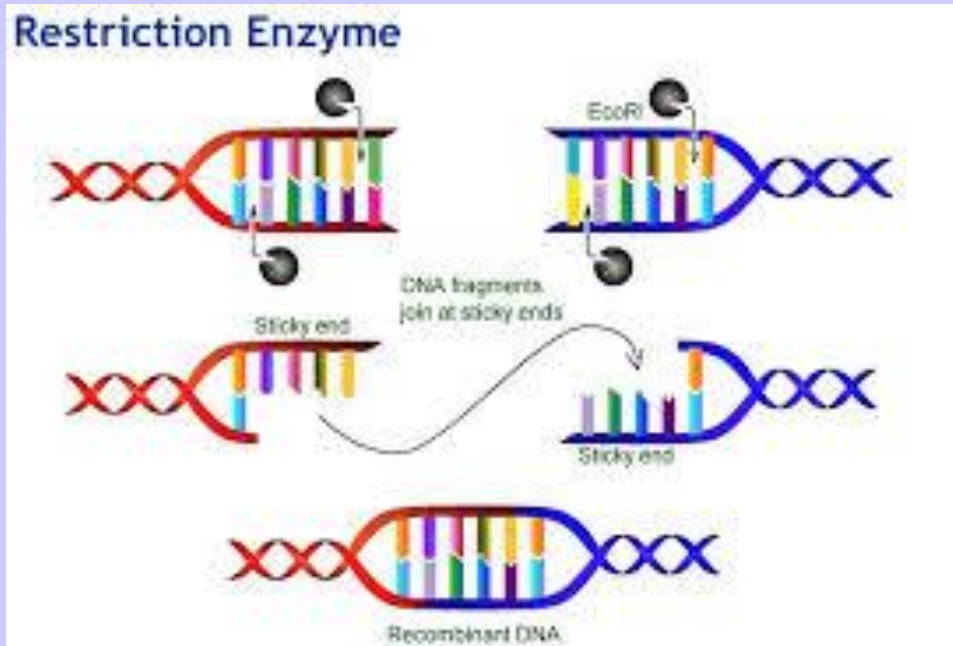
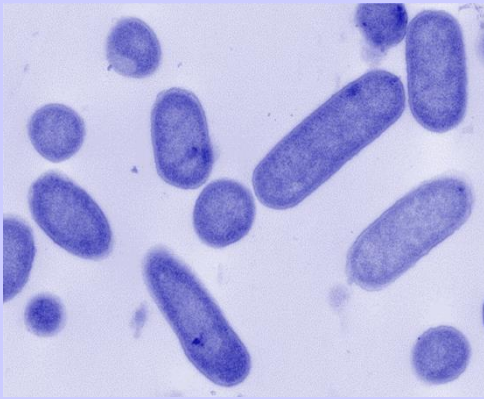


3° esercitazione: ANALISI DI RESTRIZIONE DEL DNA PLASMIDICO



I plasmidi sono genomi accessori



PLASMIDI

Sono circoli di DNA a doppia elica extracromosomiale che si ritrovano in natura e si replicano indipendentemente conferendo un VANTAGGIO SELETTIVO all'ospite



PLASMIDI - caratteristiche



origine di replicazione, legata al numero di copie presenti nella cellula
funzioni non essenziali ma vantaggio selettivo in certe condizioni

Sulla base di queste caratteristiche, i plasmidi sono stati **MANIPOLATI** ottenendo plasmidi ricombinanti o **VETTORI**

VETTORI di clonaggio

origine di replicazione

geni reporter, marker selettivi per resistenza ad antibiotici

sito di clonaggio multiplo

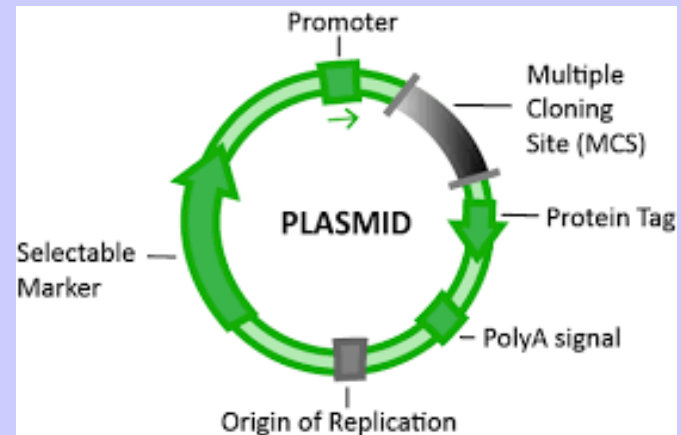
VETTORI di espressione

presenza di un promotore inducibile

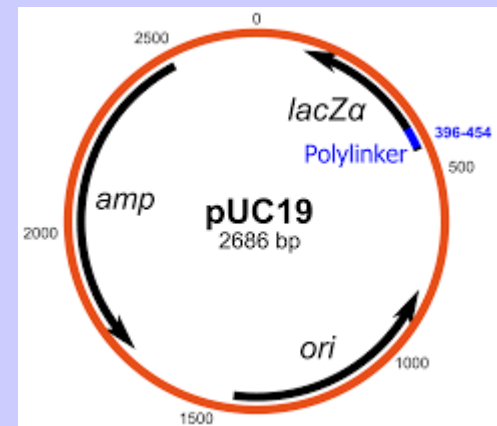
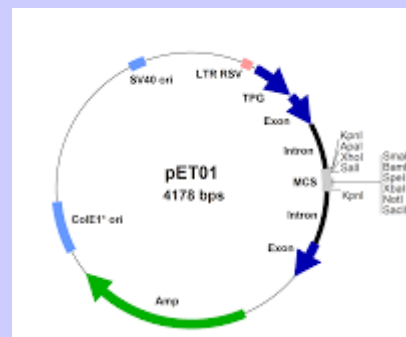
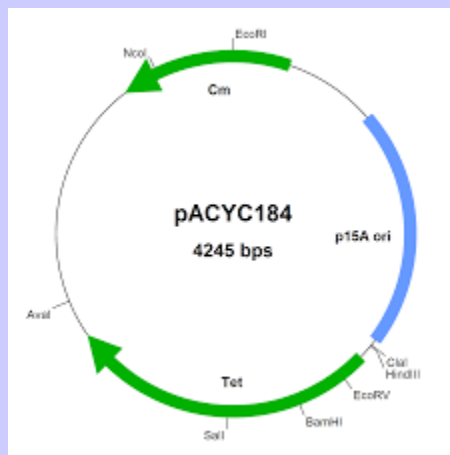
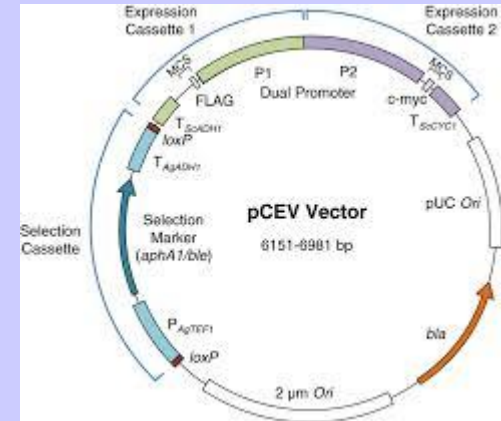
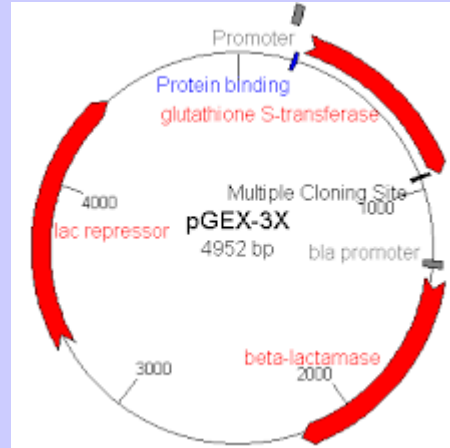
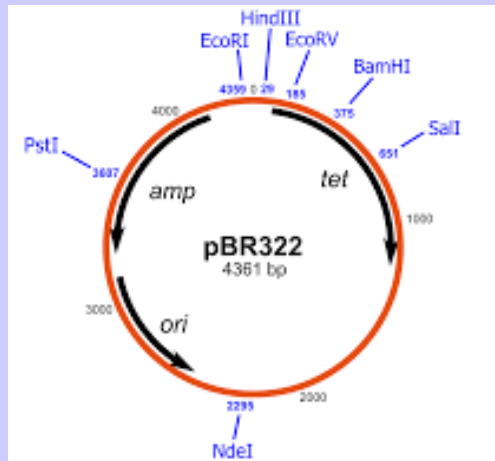
origine di replicazione

geni reporter, marker selettivi per resistenza ad antibiotici

sito di clonaggio multiplo

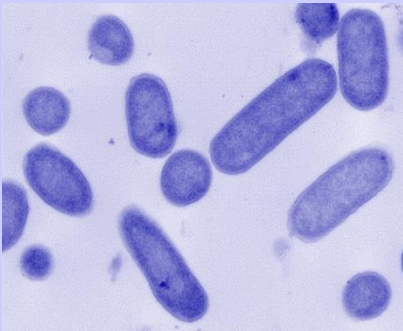


VETTORI comunemente usati

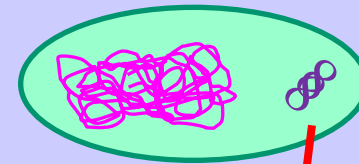
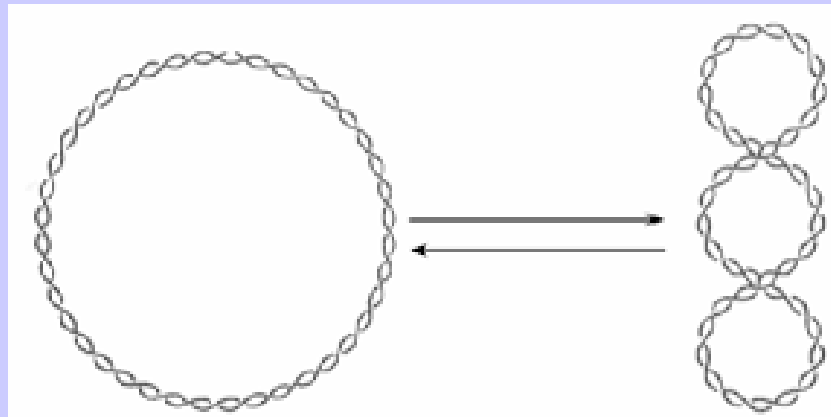


PLASMIDI - caratteristiche

*DIMENSIONI: solitamente sotto le 10.000 bp
mediamente 2500-5000 bp*



Essendo circolare, il superavvolgimento ne consente la compattazione per favorire un minor ingombro all'interno della cellula batterica

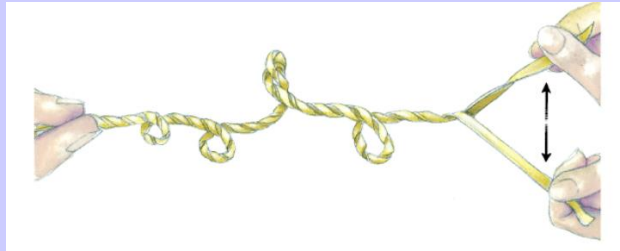


PLASMIDI - caratteristiche

SUPERAVVOLGIMENTO (*supercoil*)

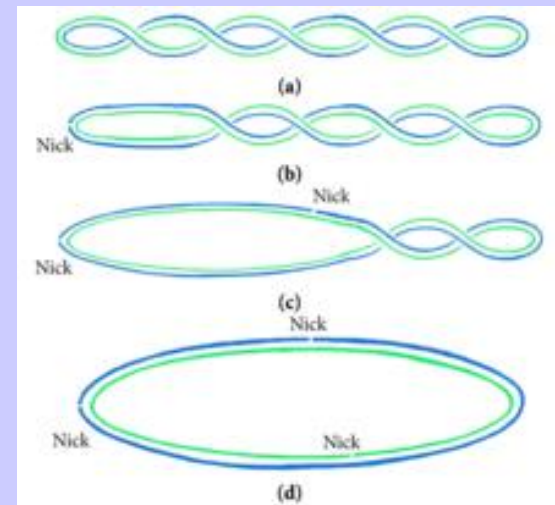
All'interno della cellula il DNA è compattato per diminuirne l'ingombro **ma allo stesso tempo le informazioni contenute devono essere sempre prontamente accessibili**

Per avere superavvolgimento le estremità dell'elica devono essere vincolate



Il DNA plasmidico è un circolo chiuso quindi vincolato

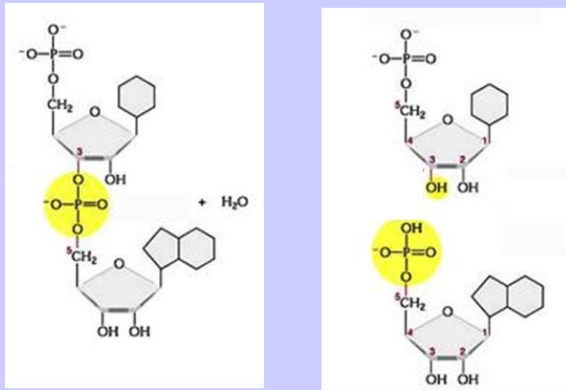
grado di superavvolgimento



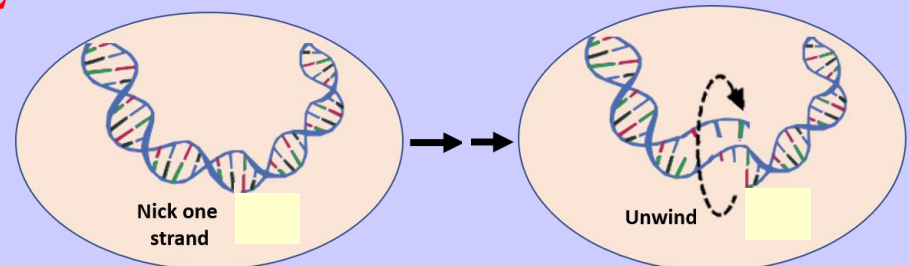
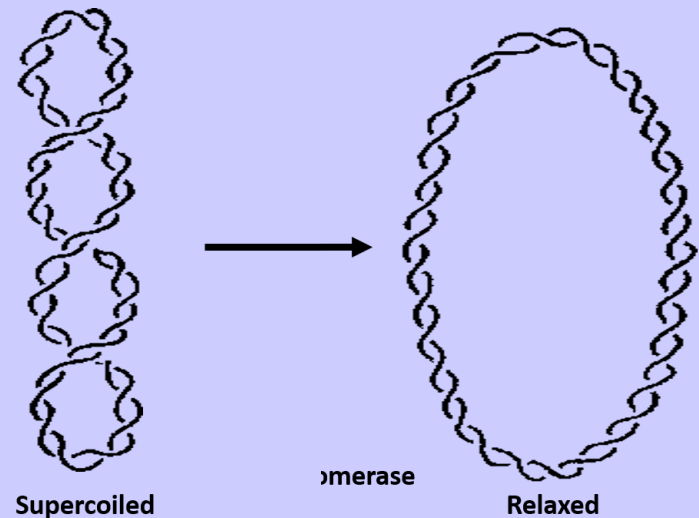
Vari fattori possono causare la perdita del superavvolgimento con l'introduzione di *nicks* su uno dei due filamenti

azione enzimatica (es. DNAsi, endonucleasi, etc)
danni fisici (es. radiazioni UV, raggi X etc)
danni chimici (presenza radicali liberi, stress ossidativo, etc)

la compattazione diminuisce e l'ingombro aumenta

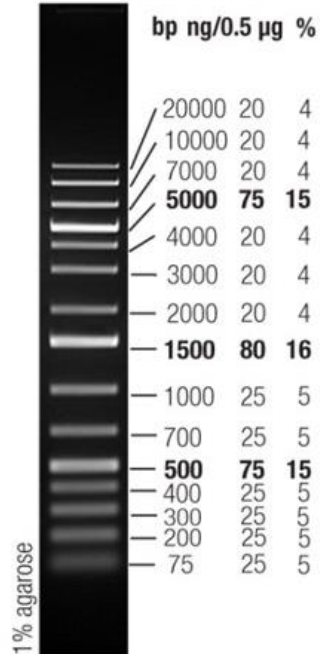


LA ROTTURA DEL LEGAME FOSFODIESTEREO NON INFLUISCE SULL'APPAIAMENTO DELLE BASI!

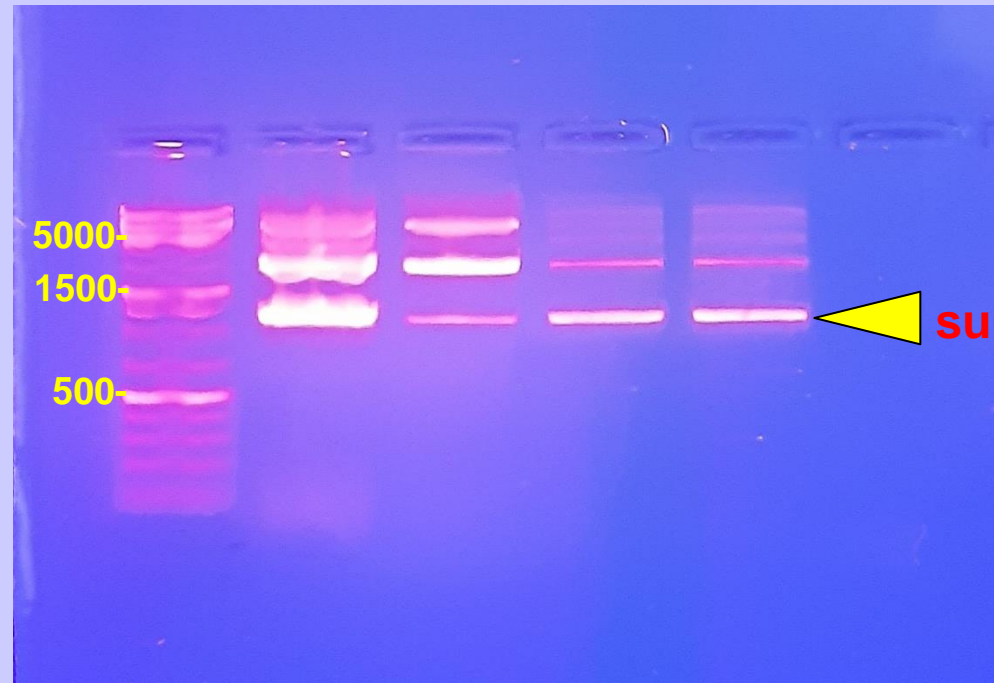


Il nostro punto di partenza - Il plasmide estratto e purificato è analizzato sul gel di agarosio

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min



Enzimi di restrizione - scoperta

The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 1978

Werner Arber
Daniel Nathans
Hamilton O. Smith

Share this



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978



Photo from the Nobel Foundation
archive.

Werner Arber

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation
archive.

Daniel Nathans

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation
archive.

Hamilton O. Smith

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978 was awarded jointly to Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton O. Smith "for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics."

Enzimi di restrizione - origine

Sono stati scoperti nei batteri sono enzimi che tagliano le molecole di DNA estranee ad esempio derivanti da infezioni fagiche, mentre il DNA *self* del batterio è protetto

La scoperta degli enzimi di restrizione ha reso possibile lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante.

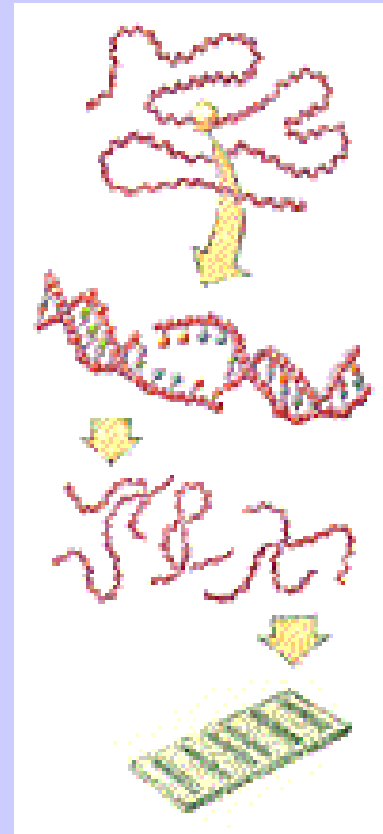
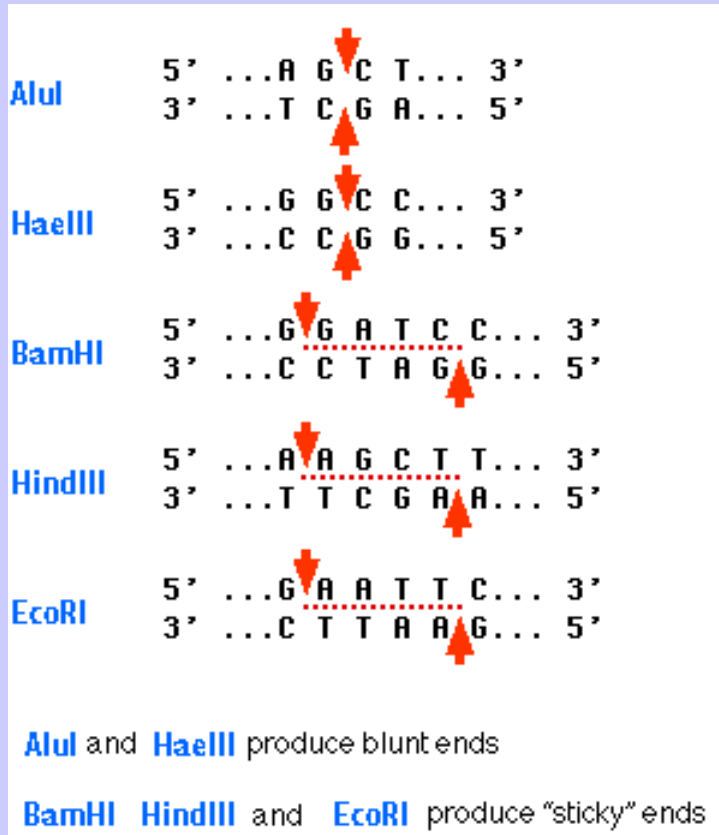
sono endonucleasi che catalizzano la scissione di ENTRAMBI i filamenti di DNA in corrispondenza di una specifica sequenza nucleotidica

Enzimi di restrizione - nomenclatura

Le differenti specie batteriche reagiscono alle infezioni sintetizzando endonucleasi a seconda dell'infezione da parte di DNA fagico che subiscono. La nomenclatura è basata sul criterio suggerito dagli scopritori secondo cui si usa un acronimo di 3 lettere. La prima lettera deriva dal genere del batterio da cui l'enzima è stato isolato e le seconde due dalla sua specie.

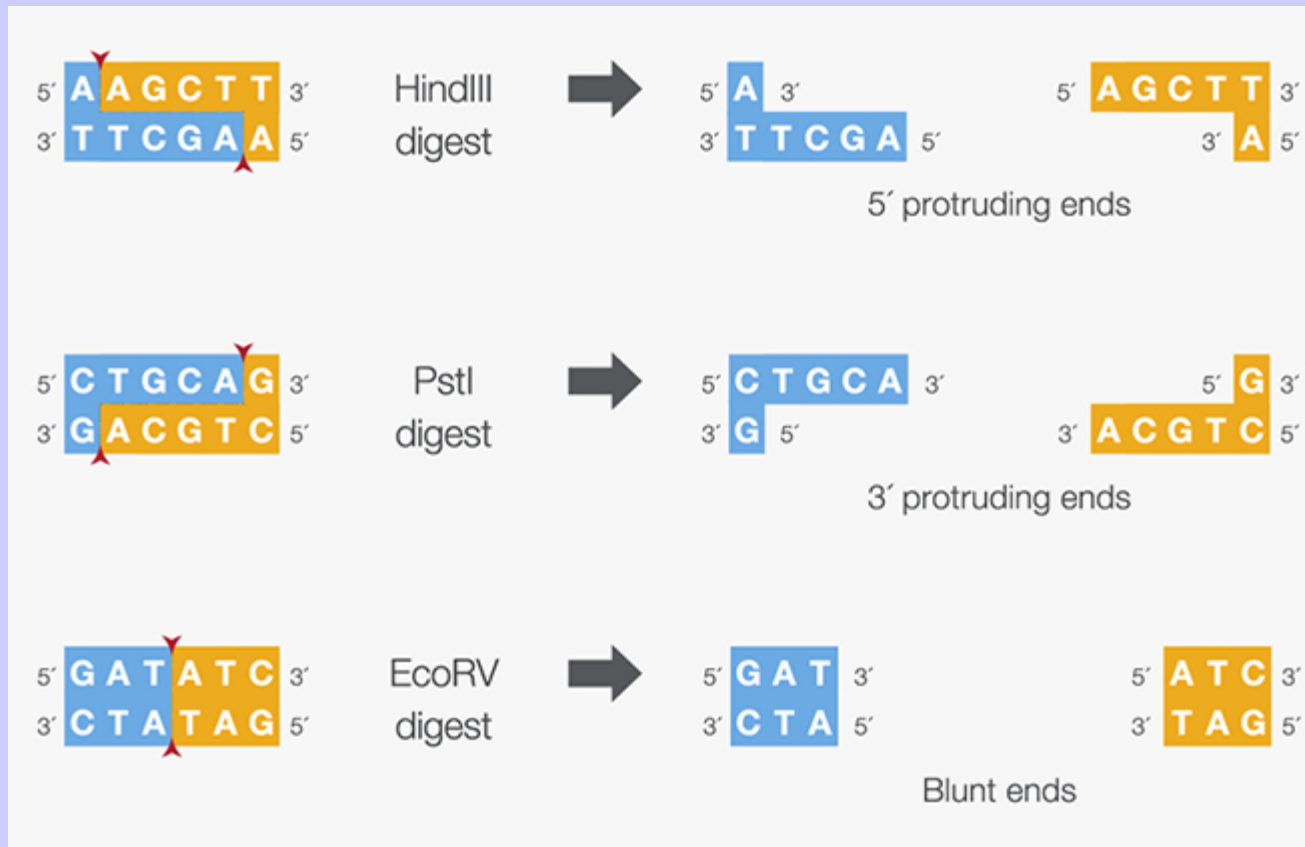
Name of the enzyme	Source
Eco R1	<i>E. coli</i> RY13
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> H
Sal I	<i>Streptomyces albus</i> G
Bal I	<i>Brevibacterium albidum</i>
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius</i>
Sma I	<i>Serratia marcescens</i>

Enzimi di restrizione - funzione

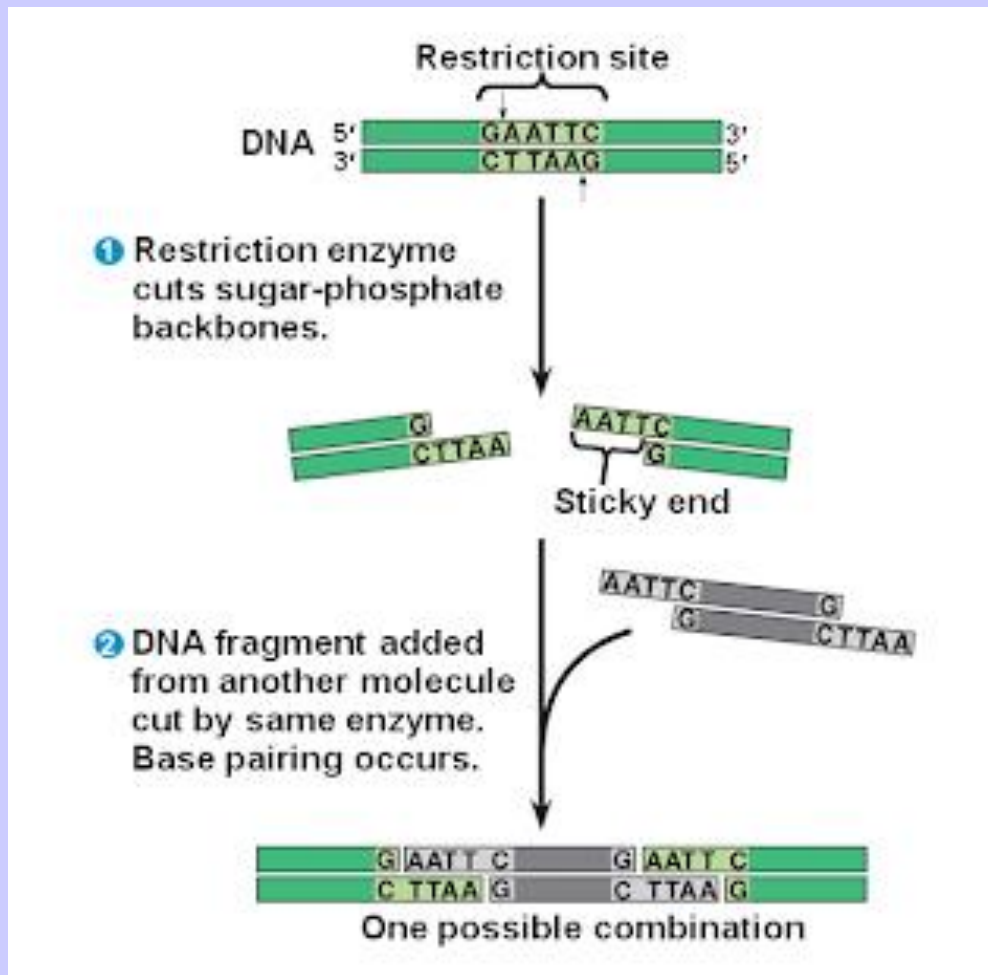


riconoscono **sequenze palindromiche** di lunghezza compresa tra le **quattro** e le **otto** basi

Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA con modalità di taglio diverse

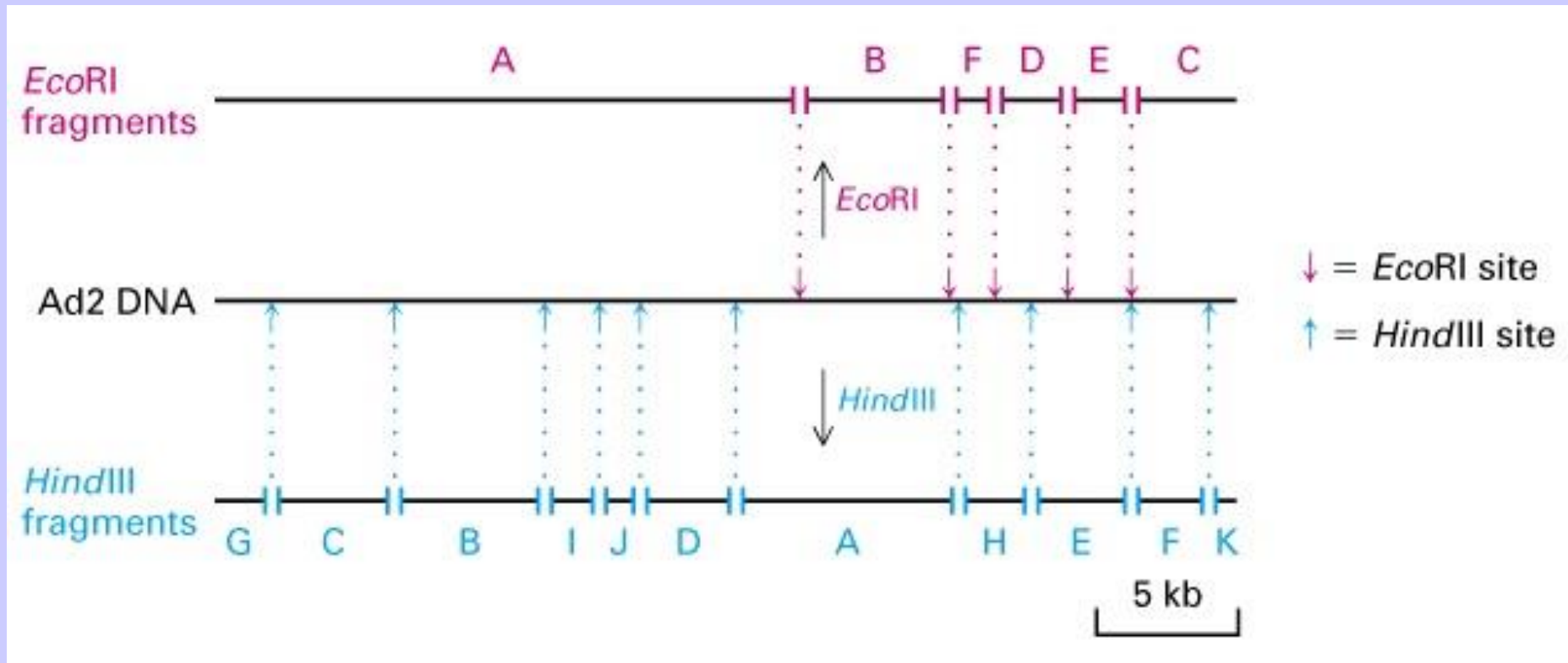


Le modalità di taglio diverse degli enzimi di restrizione permettono la ricombinazione del DNA

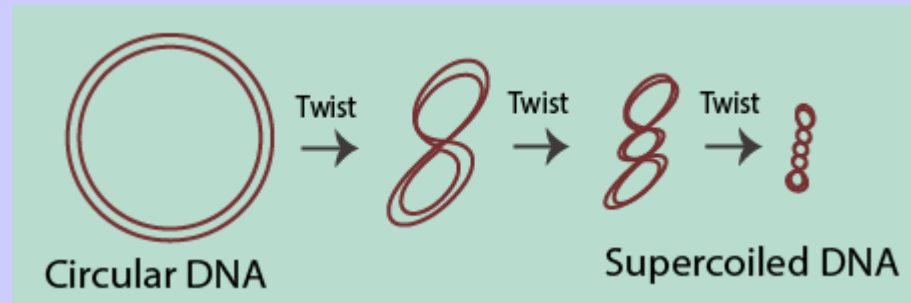


Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA in modo
caratteristico e riproducibile

MAPPA DI RESTRIZIONE



Analisi elettroforetica di plasmidi



What's the TOPOLOGY of this PLASMID?

MOLECULAR WEIGHT STANDARD LADDER

LINEAR pieces of known length

NICKED

LINEARIZED

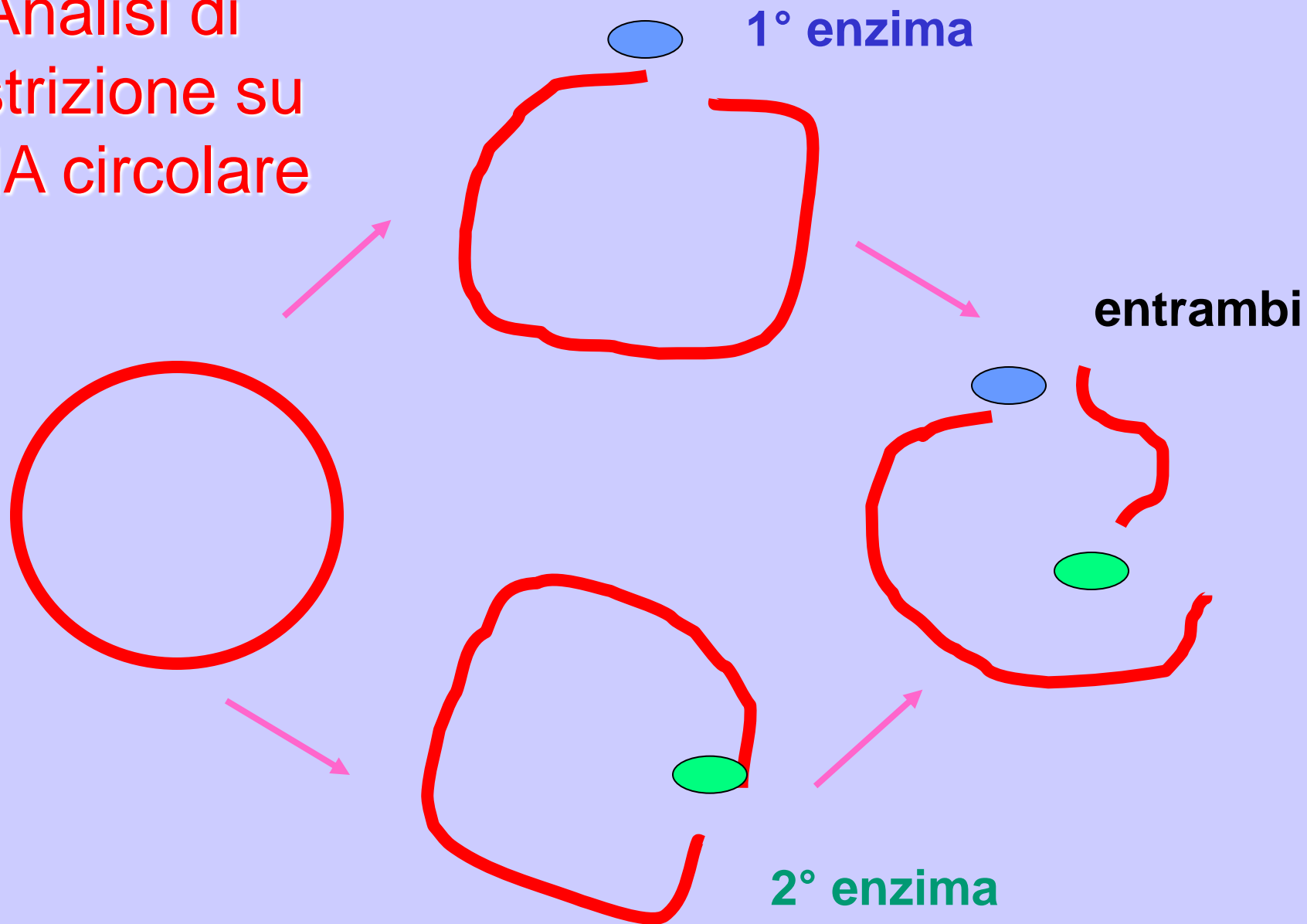
SUPERCOILED

things LONGER than plasmid

plasmid-length DNA

things SHORTER than plasmid

Analisi di restrizione su DNA circolare



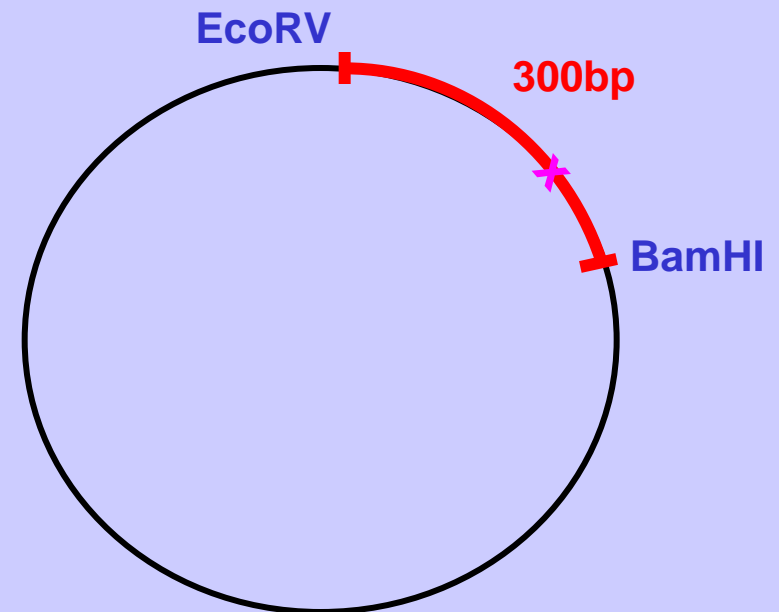
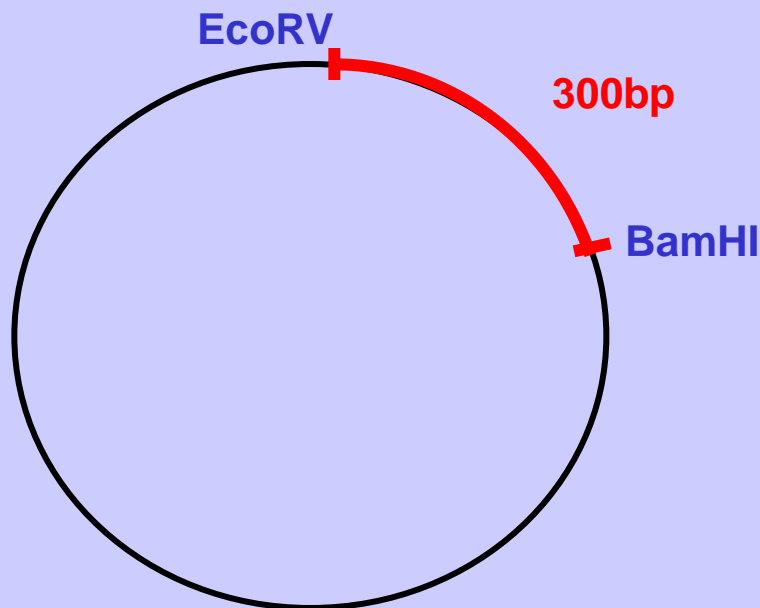
Mutazione nella sequenza del gene codificante per la G6PD

TCTTC sito di taglio MboII, quando C (WT) MUTA in T si forma il sito di taglio

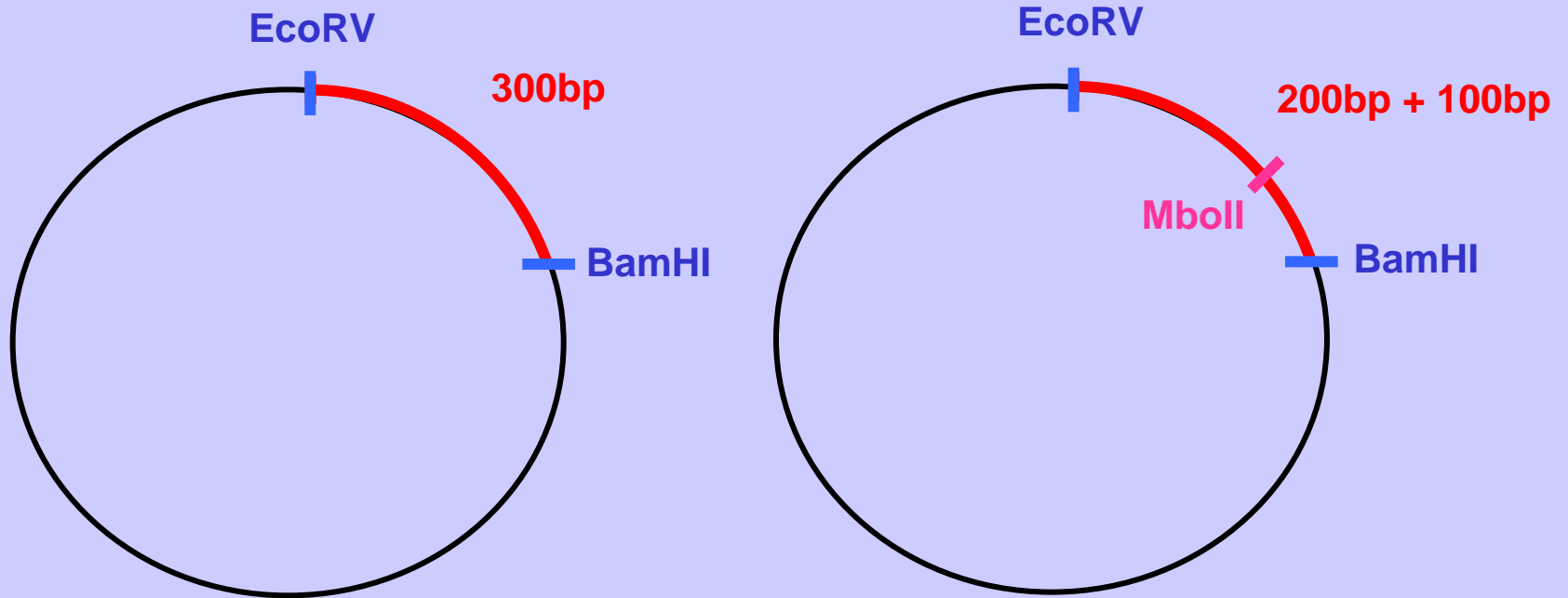
EcoRV

MboII
T

GAAGCCCTTCGGGAGGGACCTGCAGAGCTCTGACCGGCTGTCCAACCACAT**TCTTC**TCCCTGTTCCGTGAGGACCAGATCT
ACCGCATCGACCACTACCTGGGCAAGGAGATGGTGCAGAACCTCATGGTGCTGAGGTGGGGCCAAGCCTGGGCCGGGGGA
CCAGGGTGGGGGTGGTACTCAGGAGCCTCACCTGGCCCACTGCCTCCCCGAGGACGAATTCCTCCAGAACTCAGACAAGG
GTGACCCCTCACATGTGGCCCCTGCACCA **BamHI**



In quale dei due plasmidi è stata clonata la regione del gene che reca la sequenza mutata?



TCTTC sito di taglio MboII, quando C (WT) MUTA in T si forma il sito di taglio

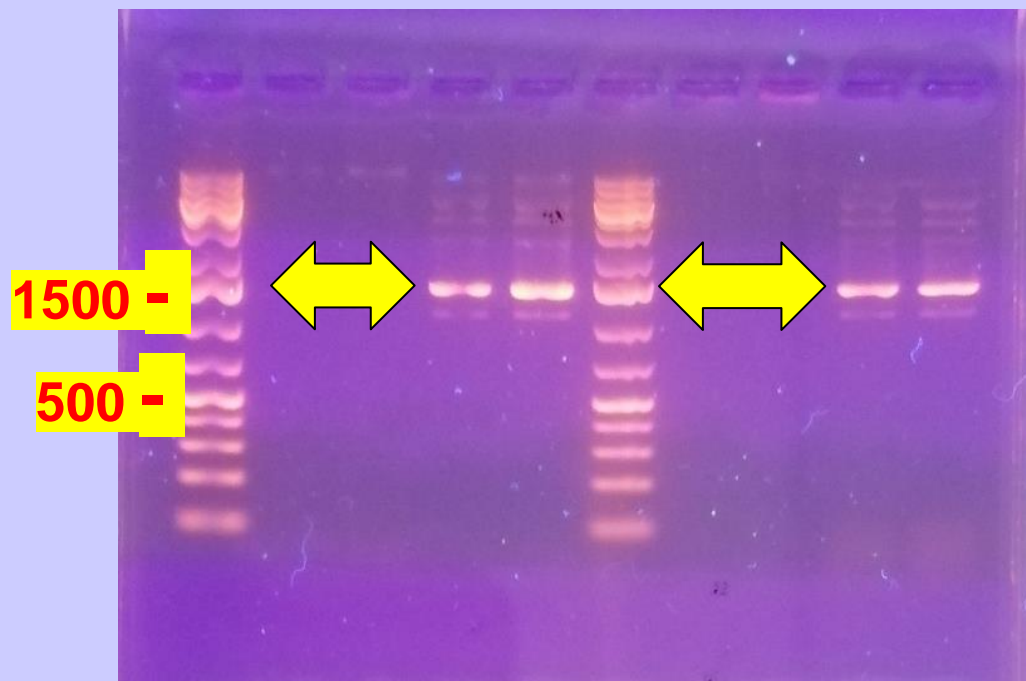
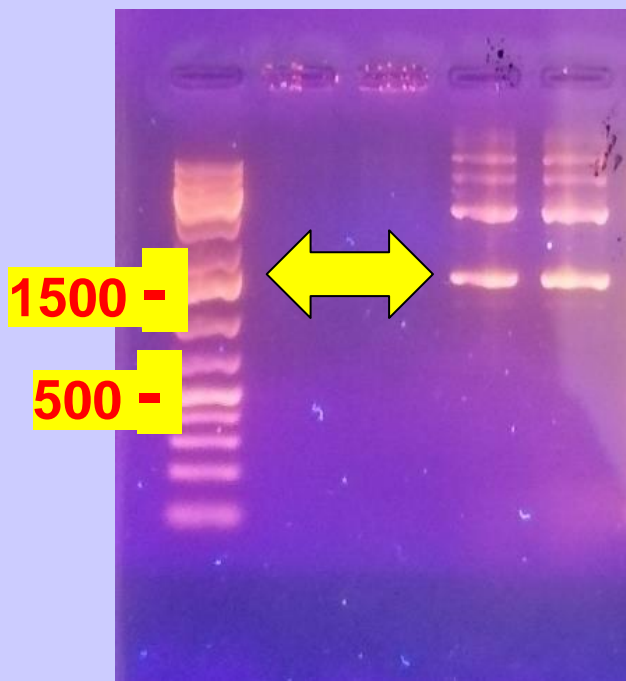
EcoRV

MboII

T

GAAGCCCTTCGGGAGGGACCTGCAGAGCTCTGACCGGCTGTCCAACCACA**TCTTC**TCCCTGTTCCGTGAGGACCAGATCT
ACCGCATCGACCACTACCTGGGCAAGGAGATGGTGCAGAACCTCATGGTGCTGAGGTGGGGCCAAGCCTGGGCCGGGGGA
CCAGGGTGGGGGTGGTACTCAGGAGCCTCACCTGGCCCCTGCCTCCCCGAGGACGAATTCCTCCAGAACTCAGACAAGG
GTGACCCCTCACATGTGGCCCCTGCACCA **BamHI**

Cosa è stato fatto –analisi DNA plasmidico estratto dal clone batterico



Cosa è stato fatto - allestimento reazioni digestione con enzimi di restrizione sui DNA plasmidici per distinguere la sequenza mutata clonata

Allestite 4 reazioni, dal campione di DNA plasmidico scelto:

-**5 μ L** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con 1 solo ER (linearizzazione) (5 μ L)**, mescolare bene

-**5 μ L** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con tutti e 2 ER (frammento clonato) (5 μ L)**, mescolare bene

-**5 μ L** e trasferirli nel tubo eppendorf con la **miscela di restrizione con i 3 enzimi (rilevamento mutazione) (5 μ L)**, mescolare bene

-**5 μ L** e trasferirli nel tubo eppendorf e aggiungere **5 μ L** di acqua (**CONTROLLO**), mescolare bene

Centrifugare brevemente tutte le provette per accertarsi che **tutto il volume rimanga sul fondo del tubo** e metterle su un rack per l'incubazione delle reazioni a 37°C

