

# Proprietà di Biopolimeri

a.a. 2021-2022  
Prof. R. Urbani

**Determinazione della struttura  
primaria di Acidi Nucleici**

# Storia della sequenza del DNA

Avery propone il DNA  
come materiale genetico

1944

Holley sequenza il tRNA  
di lievito

1965

**METODO SANGER**  
(terminazione di catena)  
**METODO MAXAM-GILBERT**  
(degradazione chimica)

1977

Parziali modificazioni chimiche del DNA e successiva lisi  
della catena nel sito adiacente al nucleotide modificato

**KARY MULLIS**  
Introduce la PCR

1983

1869

Miescher osserva  
per la prima volta il DNA

1953

Watson e Crick determinano la  
struttura della doppia elica

1970

Vengono sviluppate le tecniche  
per la sintesi degli oligonucleotidi e per  
la degradazione chimica del DNA. Viene  
introdotta l'elettroforesi su gel per la  
Separazione di frammenti di DNA

1980

Il DNA genomico viene clonato nel fago M13  
o in vettori plasmidici, nascono i primi  
Programmi informatici di analisi dei dati,  
vengono sviluppate  
nuove tecnologie per il sequenziamento

1989

**AUTOMAZIONE PARZIALE**  
Vengono sviluppate le prime  
Apparecchiature per il sequenziamento  
che impiegano sistemi  
per la rilevazione della fluorescenza.

**BANCHE DATI!!!!!!!**

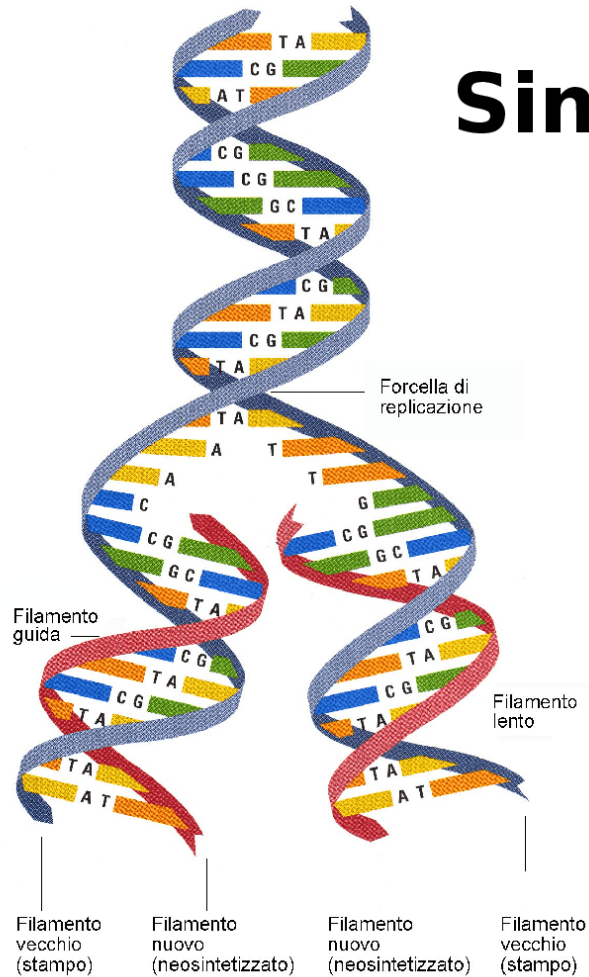
Automazione completa  
Sequenziamento completo  
del genoma umano

2003

**Metodo di SANGER per sequenziare oligonucleotidi  
(Dideoxynucleotide chain termination)**

**Metodo di terminazione di catena  
(o dei dideossinucleotidi)**

# Sintesi (replicazione) del DNA



T  
C  
A  
G  
G  
C  
C  
A  
C  
T  
C  
T  
A  
T  
T  
G  
G  
C  
C  
A  
C  
T  
C  
T  
A  
T

A  
G  
T  
C  
C  
G  
G  
T  
G  
A  
G  
A  
T  
T  
A  
A  
C  
C  
G  
G  
T  
G  
A  
G  
A  
T  
A

T  
C  
A  
G  
G  
C  
C  
A  
C  
T  
C  
T  
A  
T  
T  
G  
G  
C  
C  
A  
C  
T  
C  
T  
A  
T

A  
G  
T  
C  
C  
G  
G  
T  
G  
A  
G  
A  
T  
T  
A  
A  
C  
C  
G  
G  
T  
G  
A  
G  
A  
T  
A

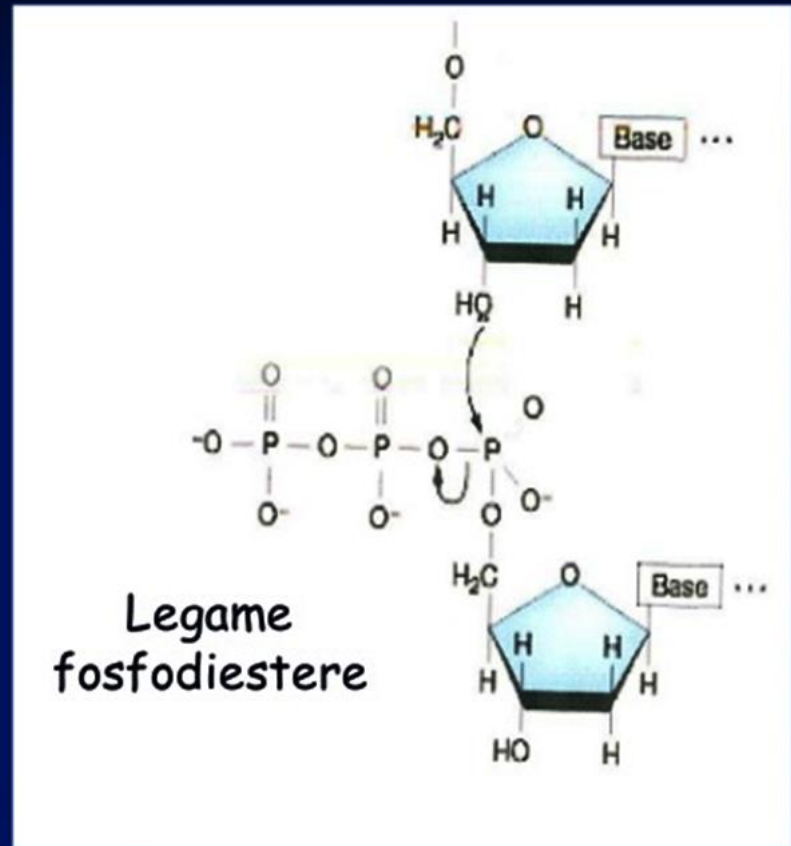
T  
C  
A  
G  
G  
C  
C  
A  
C  
T  
C  
T  
A  
T  
T  
G  
G  
C  
C  
A  
C  
T  
C  
T  
A  
T

Meccanismo di replicazione del DNA

Prodotti della replicazione del DNA

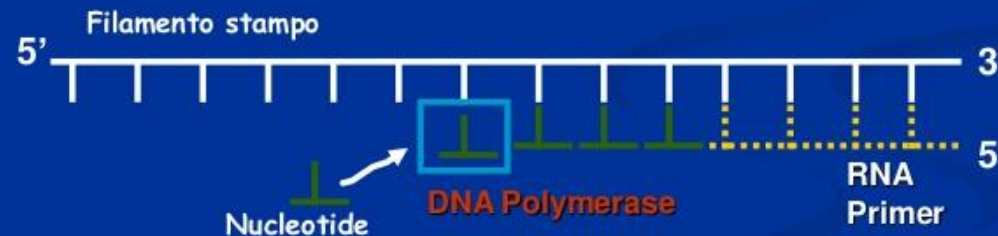
# Formazione del legame fosfodiesterico del DNA

La reazione avviene per un attacco nucleofilo da parte del gruppo ossidrilico 3' del nucleotide all'atomo di fosforo  $\alpha$  di un nucleoside 5'-trifosfato, causando il rilascio del pirofosfato e la formazione del legame. Tale reazione in vivo è catalizzata dalla DNA polimerasi



# Cosa fa la DNA polimerasi?

La DNA-polimerasi è in grado di sintetizzare il nuovo filamento solo nella direzione 5'-3' in quanto richiede un terminale 3'-OH libero a cui agganciare il nucleotide successivo. Per poter funzionare, questo complesso necessita di un innesco iniziale di RNA (*primer*)



Nessuna DNA-polimerasi è in grado di iniziare la sintesi di un filamento "da zero". Per questa ragione le DNA-polimerasi necessitano di un oligonucleotide (*primer*) complementare al filamento template. Questo primer è costituito da **poche decine di nucleotidi (18-20 basi)** e funge da innesco della reazione di amplificazione perché fornisce un gruppo idrossilico (-OH) in posizione 3' a cui la DNA polimerasi legherà il primo nucleotide del filamento neosintetizzato.

I *primer* sono utilizzati in molte tecniche di biologia molecolare che richiedono la DNA-polimerasi, come in tecniche di sequenziamento del DNA e nella reazione a catena della polimerasi (**PCR**).

**Tabella 6.1 Le DNA polimerasi eucariotiche\***

Nome	Funzione
<b>Replicasi ad alta fedeltà</b>	
Pol $\alpha$ (alfa)	Innesco della sintesi del DNA durante la replicazione e la riparazione
Pol $\delta$ (delta)	Replicazione del DNA del filamento leader (e ritardato?) durante la replicazione e la riparazione (BER, DSBR, MMR, NER)
Pol $\epsilon$ (epsilon)	Replicazione del DNA del filamento ritardato durante la replicazione e la riparazione (BER, DSBR, NER)
Pol $\gamma$ (gamma)	Replicazione e riparazione del DNA mitocondriale
<b>Riparazione ad alta fedeltà</b>	
Pol $\beta$ (beta)	BER, DSBR
Pol $\eta$ (eta)	Sintesi translesione del DNA (replicazione relativamente accurata di fronte ai dimeri timina-timina)
<b>Riparazione incline all'errore</b>	
Pol $\zeta$ (zeta)	Sintesi translesione del DNA (aggiramento dei dimeri di timina)
Pol $\theta$ (teta)	Riparazione dei legami crociati interfilamento
Pol $\iota$ (iota)	Sintesi translesione del DNA (richiesta durante la meiosi)
Pol $\kappa$ (kappa)	Sintesi translesione del DNA (delezioni e sostituzioni di basi), DSBR (unione non omologa delle estremità)
Pol $\lambda$ (lambda)	Sintesi translesione del DNA
Pol $\mu$ (mu)	DSBR (unione non omologa delle estremità)
Pol $\nu$ (nu)	Riparazione di legami crociati nel DNA?
Rev1	Sintesi di siti abasici (l'attività deossicitidil trasferasica inserisce C in un nucleotide privo di una base)

## Le DNA polimerasi batteriche

Nel batterio *E. coli* ci sono cinque DNA polimerasi principali: le DNA polimerasi I, II, III, IV e V. Insieme, queste cinque polimerasi svolgono la stessa serie di funzioni svolta dalle 14 DNA polimerasi eucariotiche.

### DNA polimerasi I

La DNA polimerasi I è stata la prima polimerasi ad essere purificata e caratterizzata ed è usata estesamente in biologia molecolare per la sua facile reperibilità e per le sue proprietà uniche. È la polimerasi più abbondante in *E. coli*, ma non è l'enzima responsabile della maggior parte della replicazione mentre ha un ruolo nella rimozione del primer, nel riempimento delle interruzioni fra i frammenti di Okazaki e nella via di riparazione per escissione dei nucleotidi (vedi Sezione 7.6). La DNA polimerasi I ha due subunità. Una subunità, chiamata frammento di Klenow, ha attività polimerasica 5'→3', mentre l'altra ha attività esonucleasica sia 3'→5' che 5'→3'. L'insieme delle due subunità è chiamato oloenzima. L'oloenzima ha la capacità esclusiva di iniziare la replicazione a livello di un nick (un legame fosfodiesterico spezzato) nell'ossatura di zucchero-fosfato del DNA. Questa proprietà è sfruttata in laboratorio con una tecnica chiamata "nick translation". Anche il frammento di Klenow è largamente usato in biologia molecolare,

per esempio, per marcare il DNA in una tecnica chiamata "random priming" (vedi Strumenti 8.5).

### DNA polimerasi III

Fu una sorpresa per i ricercatori quando si accorsero che la DNA polimerasi I, la polimerasi più abbondante, non era la polimerasi replicativa principale in *E. coli*. In effetti, un enzima molto meno abbondante, la DNA polimerasi III, catalizza la replicazione del genoma. L'oloenzima contiene 10 subunità polipeptidiche diverse. La subunità  $\alpha$  ha attività di replicasi e la subunità  $\epsilon$  ha attività di correzione delle bozze (esonucleasi 3'→5'). Anche la DNA polimerasi III ha un ruolo nelle vie di riparazione per escissione dei nucleotidi (vedi Sezione 7.6).

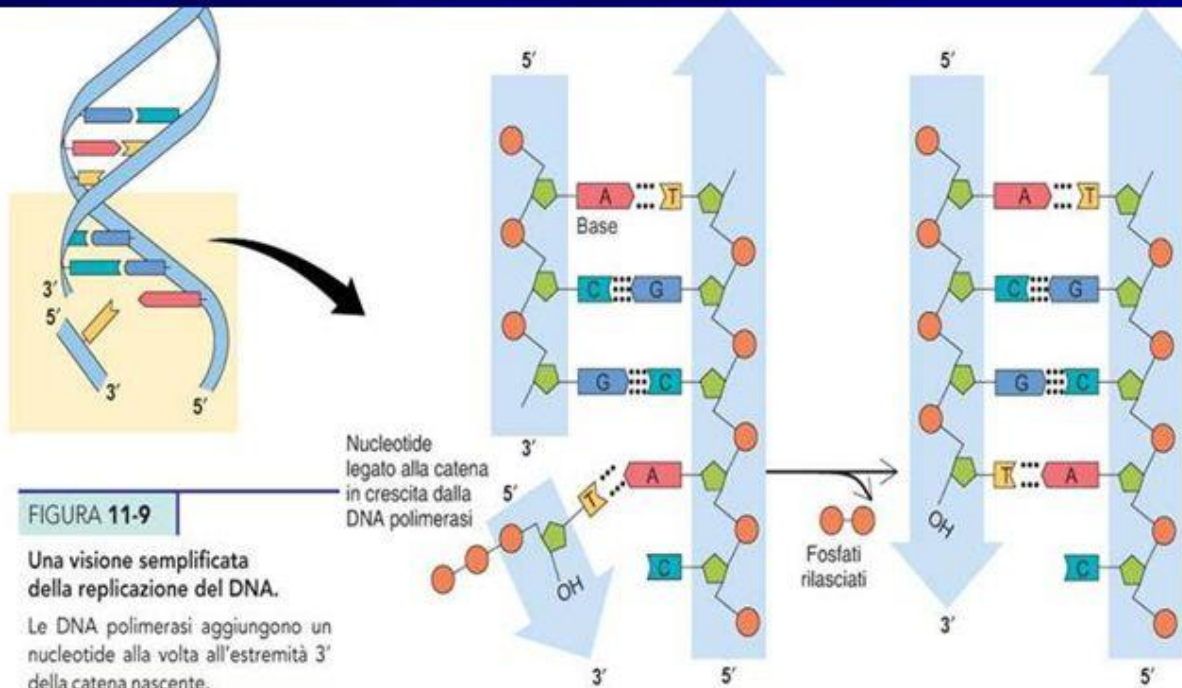
### DNA polimerasi II, IV e V

La DNA polimerasi II è coinvolta nei meccanismi di riparazione del DNA (vedi Sezione 7.4), mentre le DNA polimerasi IV e V mediano la sintesi translesione del DNA. La DNA polimerasi IV, chiamata anche DinB, è codificata dal gene *dinB*. La polimerasi V, nota anche come complesso UmuD'<sub>2</sub>C, è codificata dall'operone *umuDC*. Entrambe le polimerasi possono aggirare il danno al DNA che ha bloccato la replicazione da parte della DNA polimerasi III. Queste polimerasi possono avere un ruolo nella mutagenesi adattiva, in quanto tendono a compiere errori.



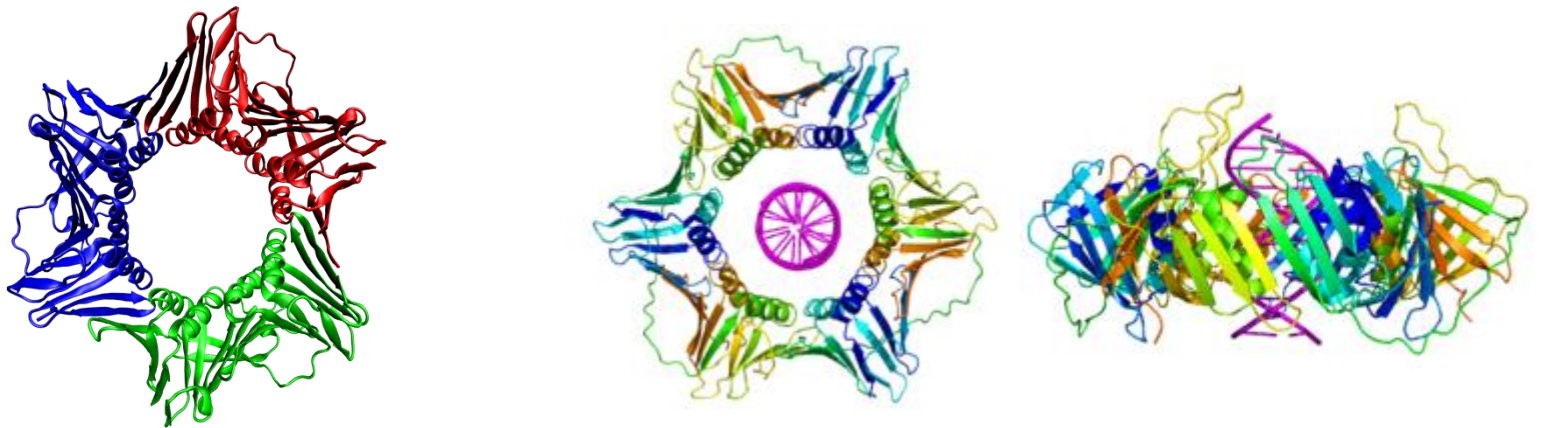
...pertanto:

- ✓ le DNA polimerasi aggiungono nucleotidi al 3' di una catena polinucleotidica preesistente
- ✓ il nuovo filamento cresce sempre dal 5' al 3'



Struttura proteica della **pinza scorrevole** di PCNA umana  
(*DNA clamp o sliding clamp*)

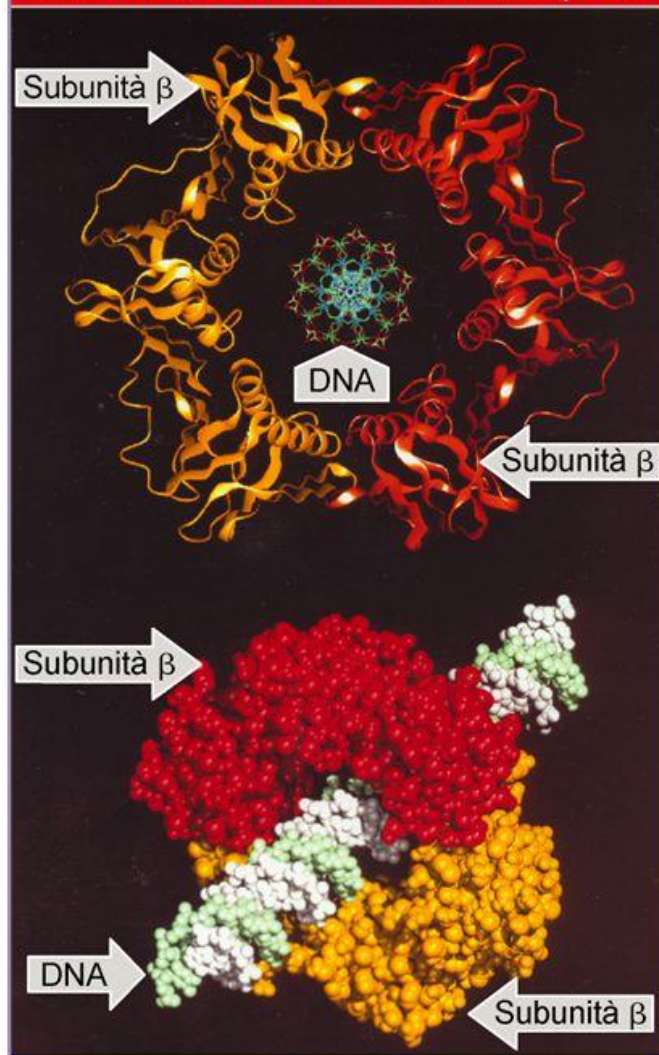
*fattore di processività per la DNA-polimerasi, promuove e controlla l'azione della polimerasi durante la replicazione*



la presenza della pinza **scorrevole** aumenta notevolmente il numero di nucleotidi che la polimerasi può aggiungere e quindi la velocità di replicazione del filamento di DNA (fino a 1.000 volte rispetto ad una polimerasi priva del clamp)

PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen (antigene di proliferazione nucleare)

Due viste del DNA circondato dalla pinza



# articles

## Nucleotide sequence of bacteriophage $\Phi$ X174 DNA

F. Sanger, G. M. Air\*, B. G. Barrell, N. L. Brown†, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison III‡, P. M. Slocombe§ & M. Smith\*

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

L'articolo descrive il primo sequenziamento di un genoma



## Metodo enzimatico di Sanger

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467, December 1977  
Biochemistry

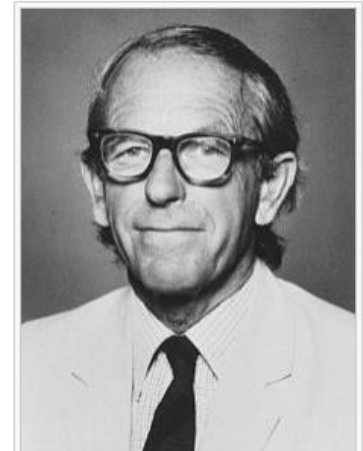
### DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

(DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage  $\phi$ X174)



F. SANGER, S. NICKLEN, AND A. R. COULSON

Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 2QH, England

*Contributed by F. Sanger, October 3, 1977*



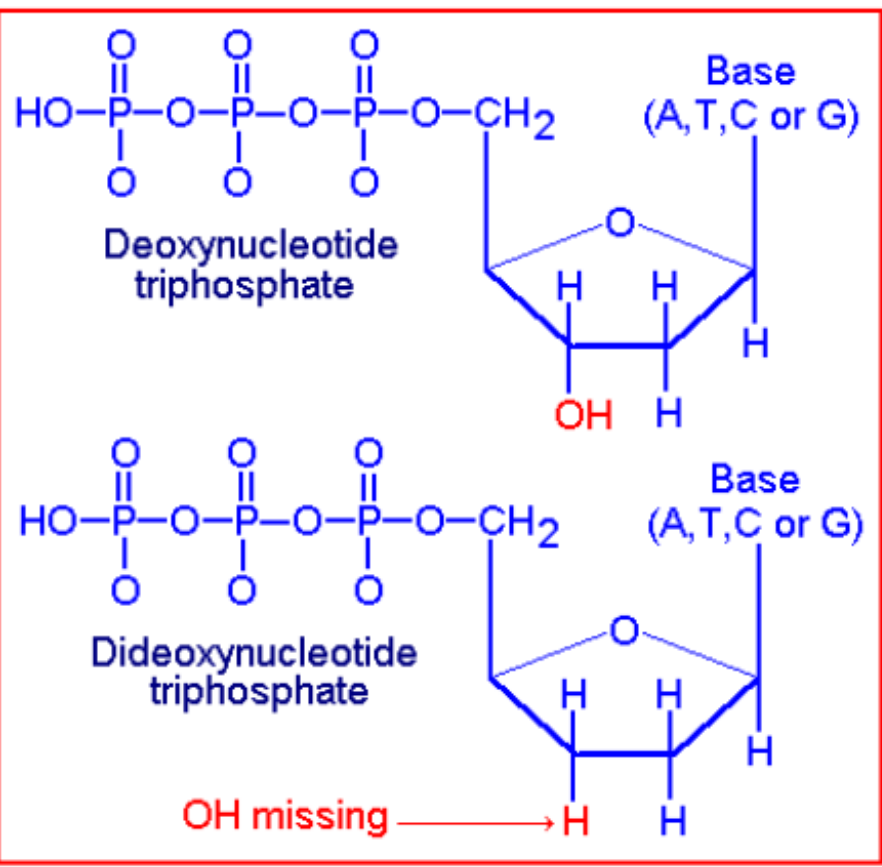
Frederick Sanger

 Premio Nobel per la chimica 1958  
 Premio Nobel per la chimica 1980

1918 - 2013

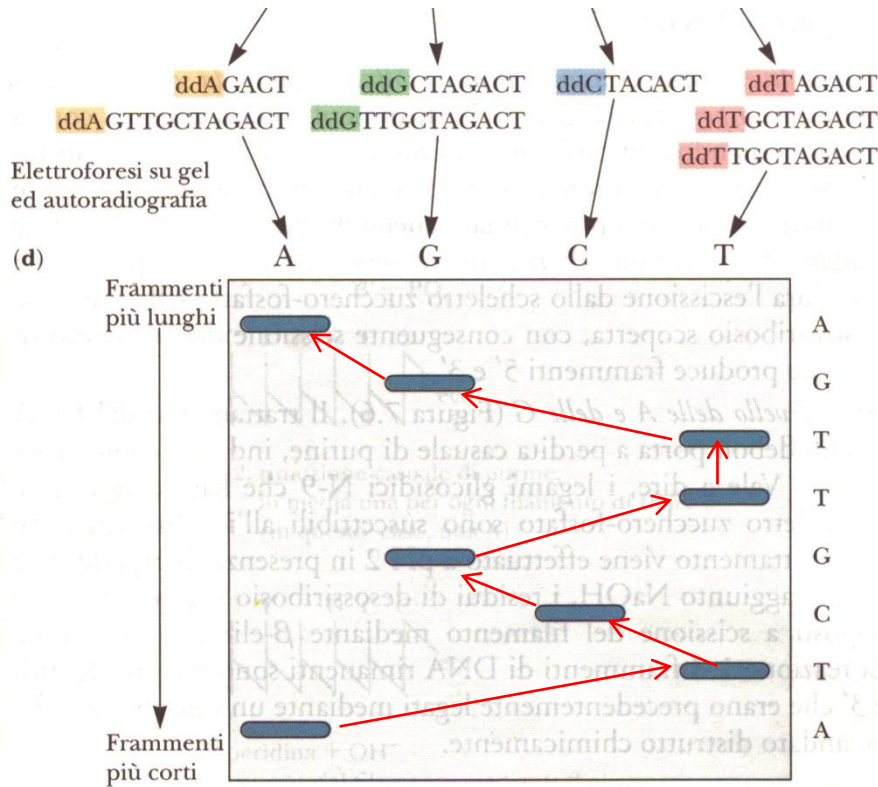
## Nucleotidi terminatori (ddNTP)

- Nucleotidi che bloccano l'allungamento del filamento di acido nucleico: la mancanza del gruppo ossidrilico in 3' impedisce l'attacco al gruppo fosforico del nucleotide successivo
- Nucleotidi marcati con  $^{32}\text{P}$  (in passato) o molecole fluorescenti (recentemente)





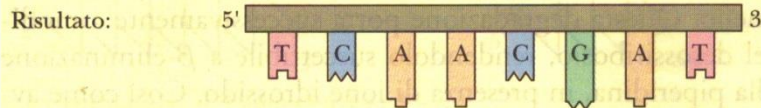
Poiché il DNA sintetizzato contiene un gruppo marcato (radio) può essere distinto dal template



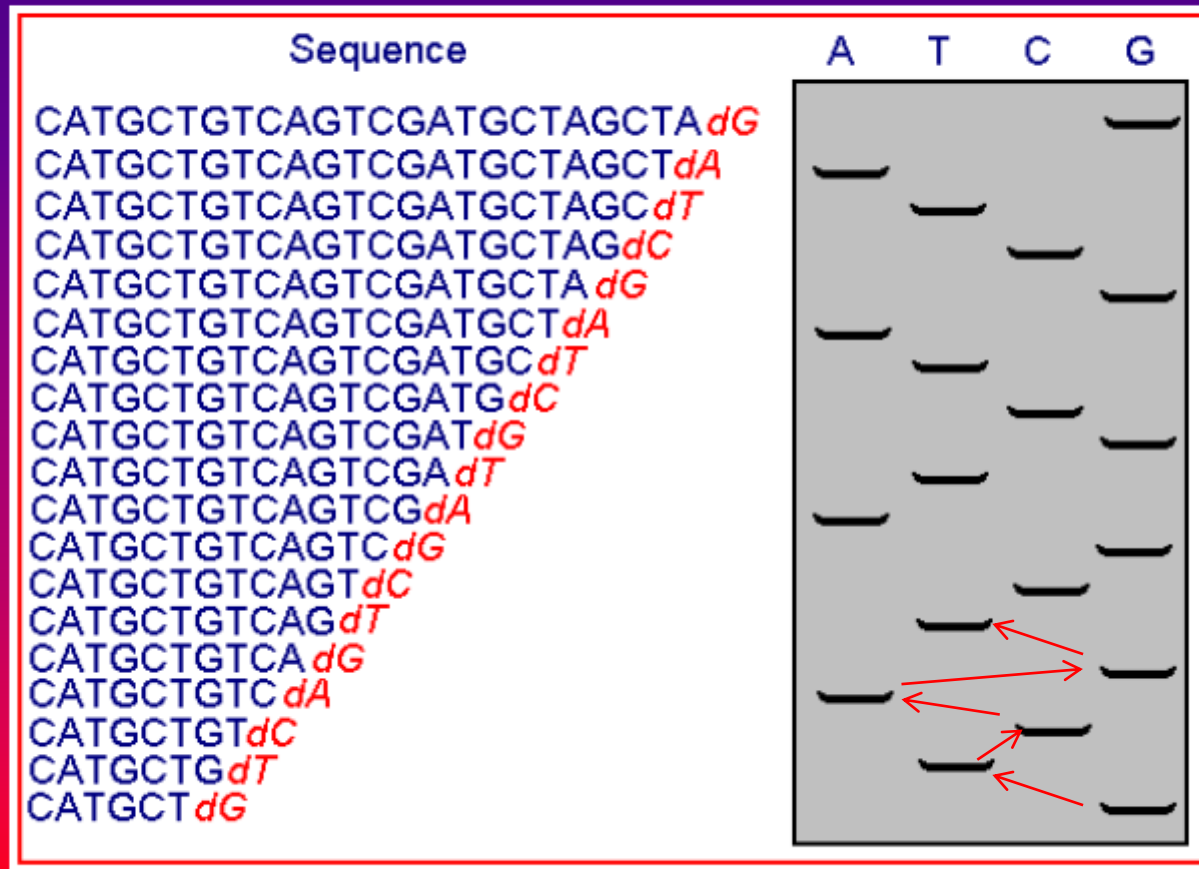
Elettroforetogramma. Si noti che la sequenza nucleotidica che si legge nel gel dal basso verso l'alto riflette l'ordine con cui i nucleotidi sono stati aggiunti dalla DNA polimerasi.

Letture della sequenza dal basso verso l'alto: -A-T-C-G-T-T-G-A-

La sequenza complementare è il filamento stampo originale (3'→5'): -T-A-G-C-A-A-C-T-

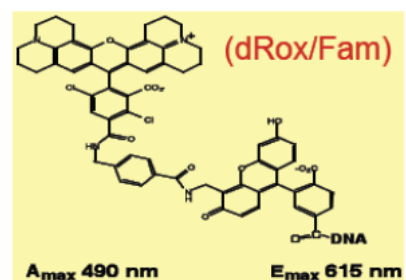
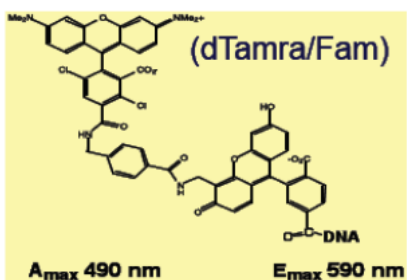
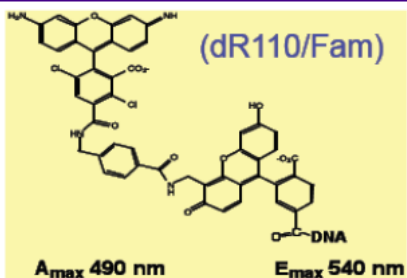
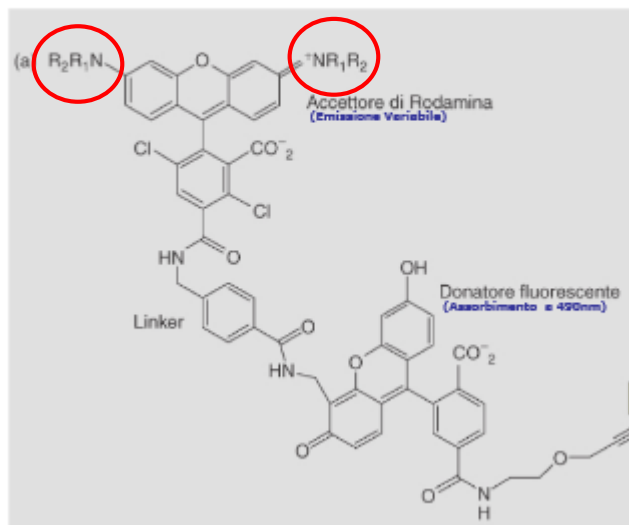


# Produzione dei frammenti (metodo di Sanger)





# Fluorocromi (BigDye™)



I quattro fluorocromi hanno differenti proprietà di emissione  
In funzione della natura dei gruppi R.

Fluorocromo	Max eccitazione	Max emissione
<b>A</b> FITC	495	519
Alexa 488	499	520
Oregon Green	513	533
PI	538	603
TRITC	552	578
Alexa 568	577	603
Texas Red	595	613
Cy5	648	665
Alexa 660	663	691
<b>B</b> Clorofilla a	430	670
Clorofilla b	460	650
<b>C</b> CFP	430	474
GFP	494	510
YFP	520	535
DsRed	553	585

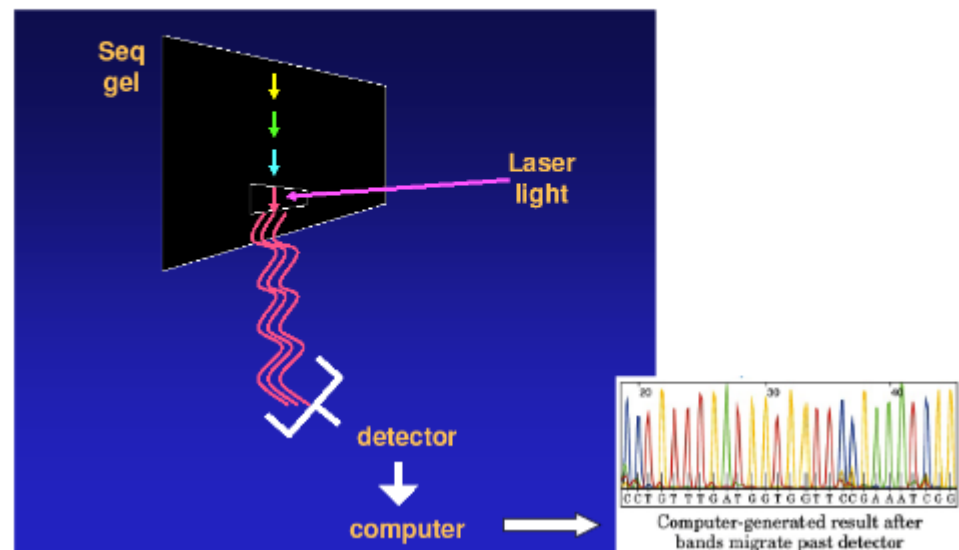
**Figura 13.4**

Massimi di eccitazione e di emissione per alcuni fluorocromi di sintesi (A), pigmenti (B) e proteine fluorescenti (C).

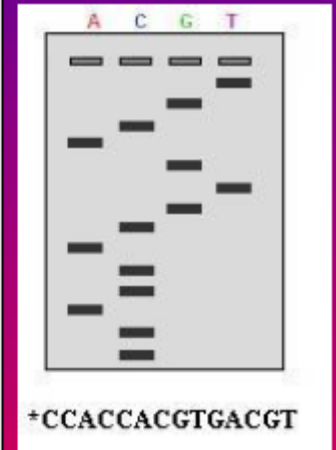
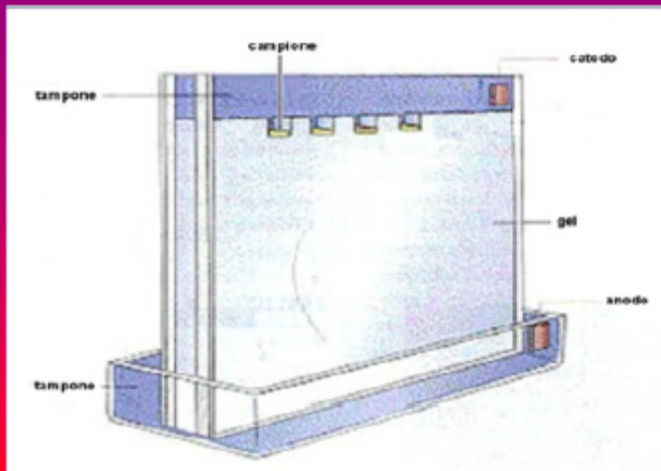
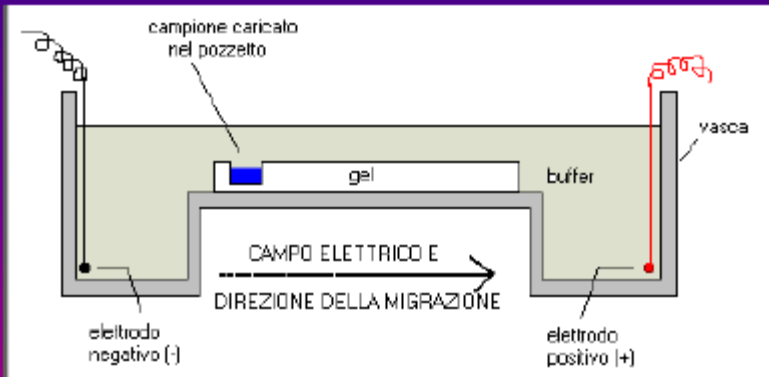
# Dye Terminator Labelling



L'intensità e la lunghezza d'onda delle emissioni fluorescenti vengono captate durante l'elettroforesi quando i frammenti di DNA, eccitati dalla luce laser, passano davanti ad un rivelatore.



# Corsa elettroforetica



Come si presenta una moderna  
lastrina di elettroforesi su gel per una  
separazione di oligonucleotidi.

< 400 basi

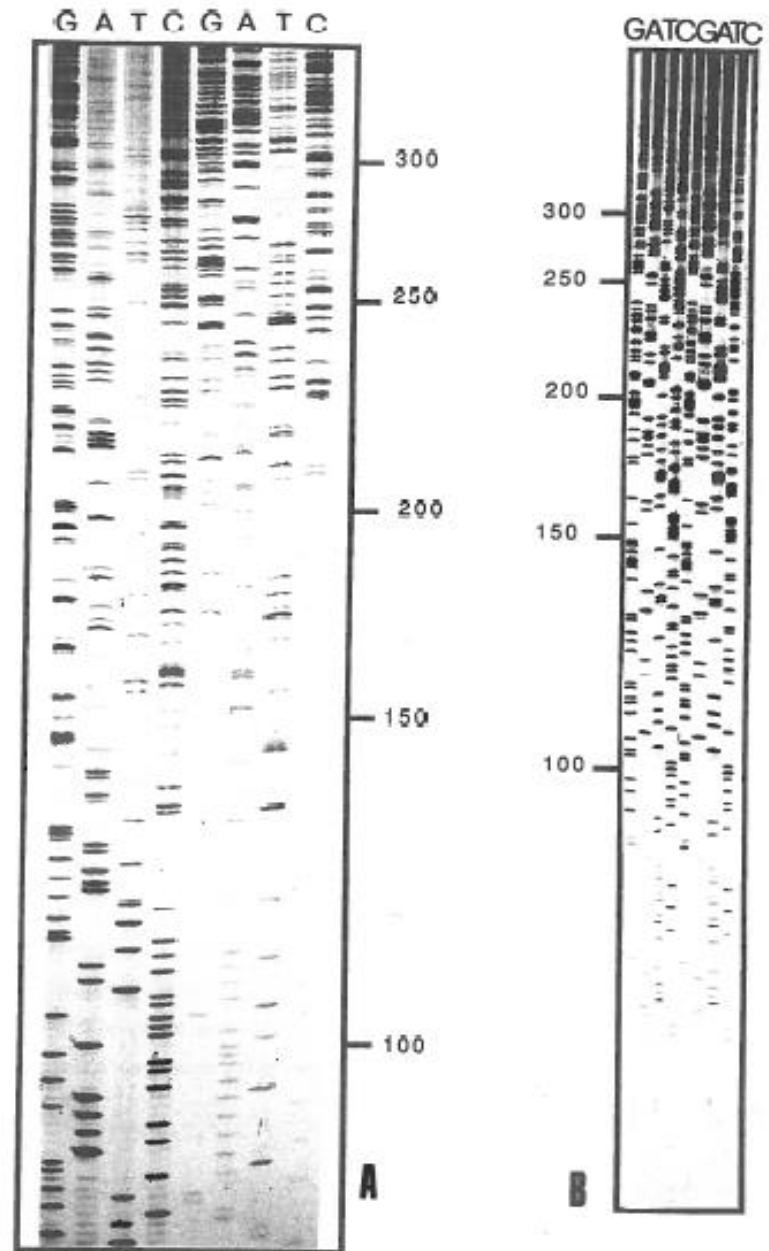
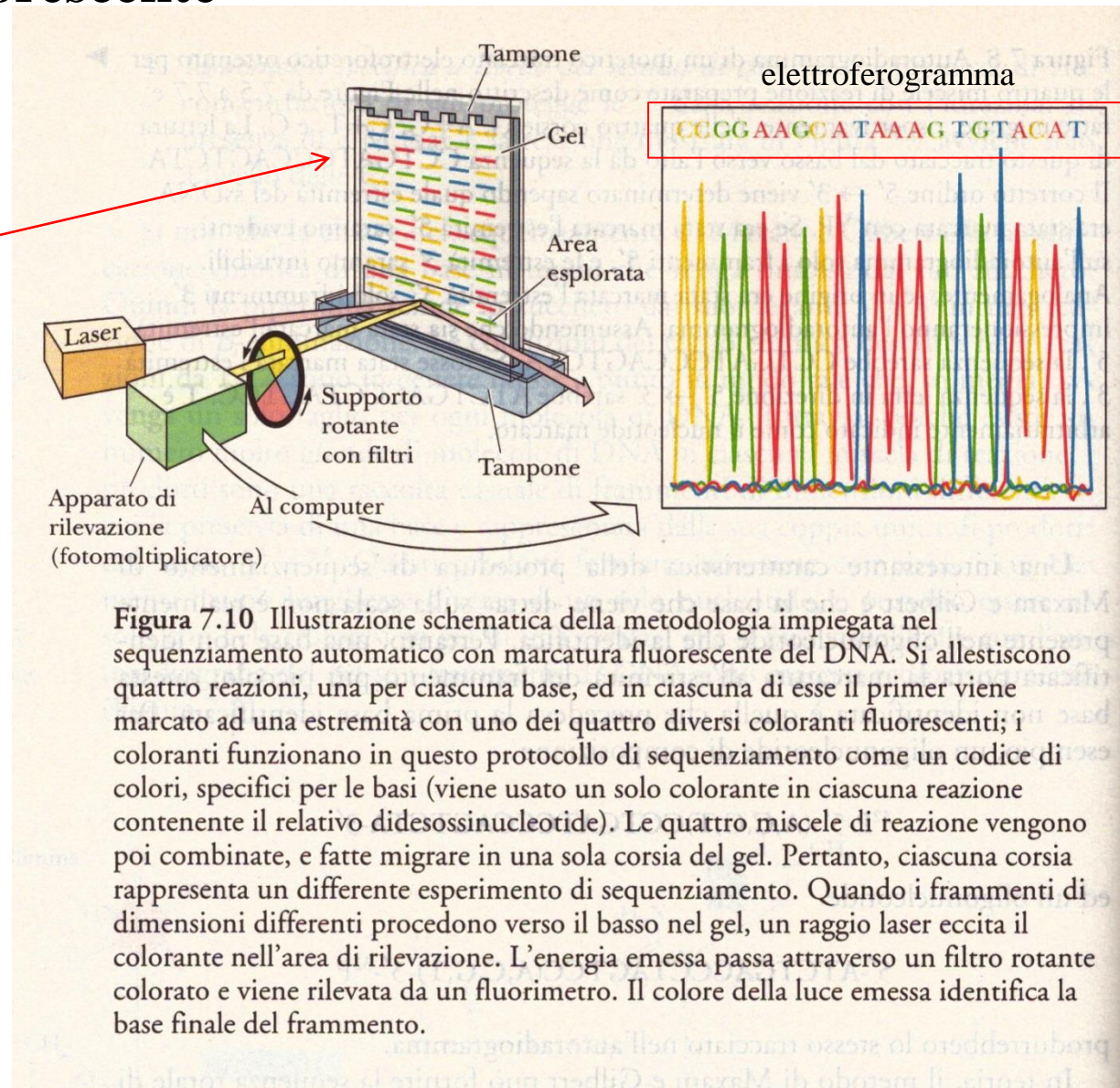


Figura 23-Comparazione di un comune gel di elettroforesi convenzionale **A**  
con un gel di elettroforesi ultrasottile **B**

# Marcatura fluorescente

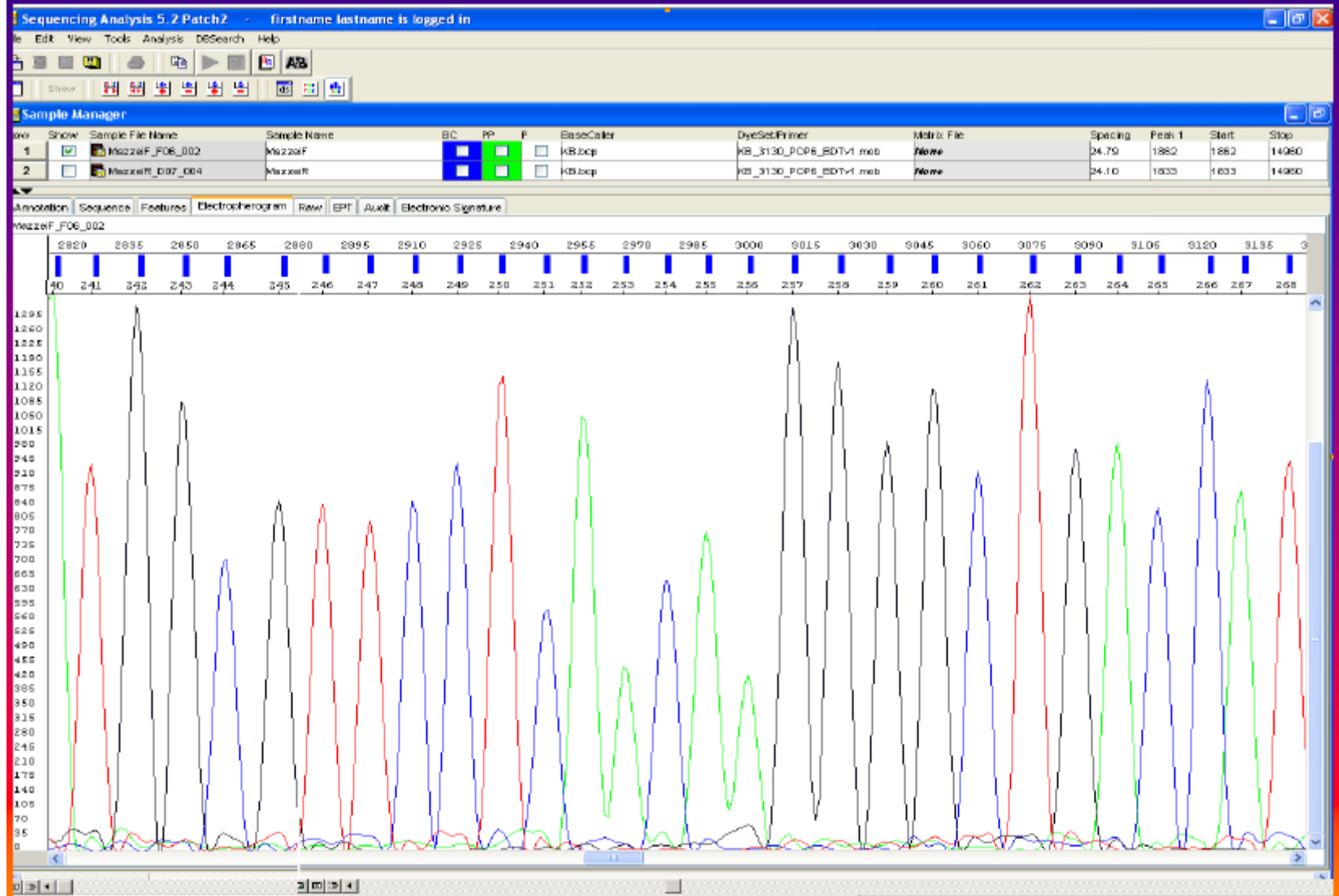
È possibile marcare il *primer* con un composto fluorescente diversamente colorato per ciascuna delle quattro miscele di reazione di terminazione

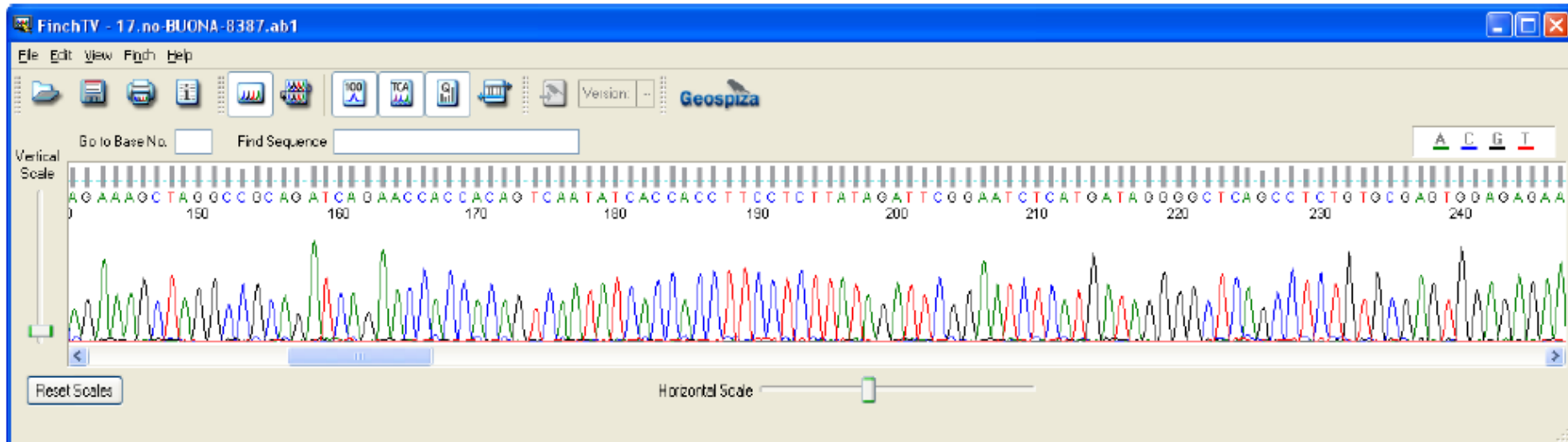


<10,000 basi

**Figura 7.10** Illustrazione schematica della metodologia impiegata nel sequenziamento automatico con marcatura fluorescente del DNA. Si allestiscono quattro reazioni, una per ciascuna base, ed in ciascuna di esse il primer viene marcato ad una estremità con uno dei quattro diversi coloranti fluorescenti; i coloranti funzionano in questo protocollo di sequenziamento come un codice di colori, specifici per le basi (viene usato un solo colorante in ciascuna reazione contenente il relativo didesossinucleotide). Le quattro miscele di reazione vengono poi combinate, e fatte migrare in una sola corsia del gel. Pertanto, ciascuna corsia rappresenta un differente esperimento di sequenziamento. Quando i frammenti di dimensioni differenti procedono verso il basso nel gel, un raggio laser eccita il colorante nell'area di rilevazione. L'energia emessa passa attraverso un filtro rotante colorato e viene rilevata da un fluorimetro. Il colore della luce emessa identifica la base finale del frammento.

# ELETTROFEROGRAMMA





# GenBank

- Banca dati ad accesso libero (internet)
- Circa 50 milioni di sequenze geniche (animali e vegetali)
- Permette il confronto della propria sequenza in tempo reale: motore di ricerca (programma blast) individua le sequenze con il più elevato grado di omologia
- Chiunque può depositarvi le proprie sequenze

## BLAST Assembled Genomes

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#).

- [Human](#)
- [Mouse](#)
- [Rat](#)
- [Arabidopsis thaliana](#)
- [Oryza sativa](#)
- [Bos taurus](#)
- [Danio rerio](#)
- [Drosophila melanogaster](#)
- [Gallus gallus](#)
- [Pan troglodytes](#)
- [Microbes](#)
- [Apis mellifera](#)

## Basic BLAST

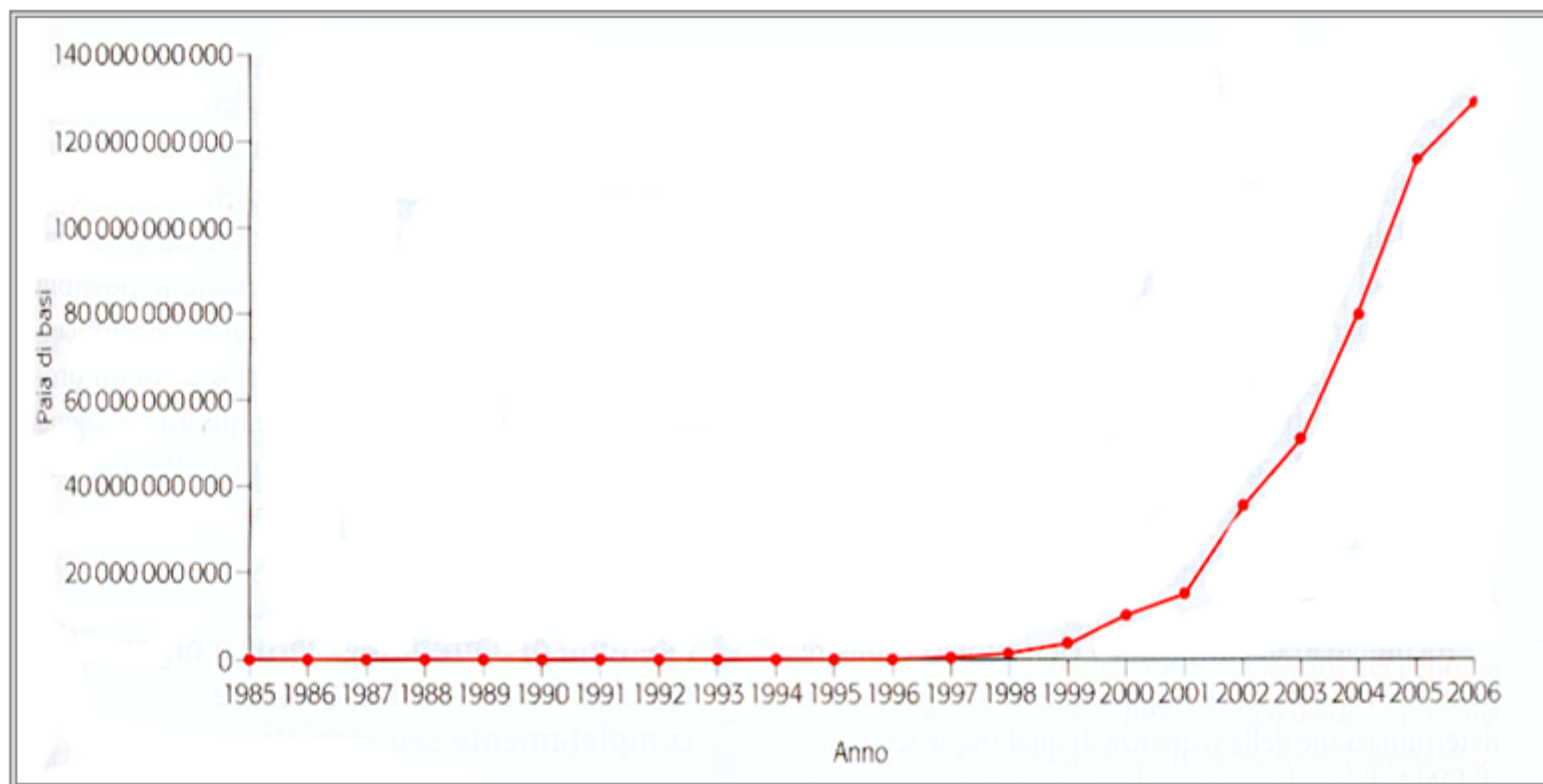
Choose a BLAST program to run.

<a href="#">nucleotide blast</a>	Search a <b>nucleotide</b> database using a <b>nucleotide</b> query <i>Algorithms:</i> blastn, megablast, discontinuous megablast
<a href="#">protein blast</a>	Search <b>protein</b> database using a <b>protein</b> query <i>Algorithms:</i> blastp, psi-blast, phi-blast
<a href="#">blastx</a>	Search <b>protein</b> database using a <b>translated nucleotide</b> query
<a href="#">tblastn</a>	Search <b>translated nucleotide</b> database using a <b>protein</b> query
<a href="#">tblastx</a>	Search <b>translated nucleotide</b> database using a <b>translated nucleotide</b> query



# SEQUENZIAMENTO DEL DNA – PROGETTO GENOMA UMANO

**Aumento delle sequenze depositate (GenBank, EBI, DBJL) dal 1985 al 2006**



## Next Generation Sequencing (NGS)

L'insieme delle tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici che hanno in comune la capacità di sequenziare, in parallelo, milioni di frammenti di DNA

Potenzialità di produrre, in un'unica seduta di analisi, una quantità di informazioni genetiche milioni di volte più grande

**3 miliardi di dollari e 13 anni di lavoro (1990-2003) di 20 diverse università e centri di ricerca** si sono resi necessari per completare nel 2003 la caratterizzazione di un genoma umano per lo "*Human genome project*". La prima bozza del genoma si è avuta nel 2000 e il completamento della sequenza nel 2003

Oggi, a pochi anni di distanza, le tecnologie NGS più avanzate consentono il sequenziamento di un genoma umano **in pochi giorni al costo di circa 1.000 dollari.**

Il vantaggio di queste tecnologie è infatti la possibilità di ottenere la sequenza di DNA amplificando il frammento



Figura 2: Passi fondamentali nell'analisi biologica delle tecnologie di nuova generazione

**Amplificazione:** La tecnologia si basa sull'analisi della luce emessa da ogni nucleotide, che permette di identificarne il tipo. Purtroppo, la luce che ognuno di questi emette è troppo ridotta, deve quindi essere amplificata. Per amplificarla si utilizza di solito la PCR (reazione a catena della polimerasi)

**Separazione:** Il filamento, amplificato al punto precedente, viene qui separato. La separazione può essere eseguita usando un picotiter plate (PTP), una specie di vetrino in grado di dividere i vari nucleotidi.

**Analisi:** Una volta che i nucleotidi sono stati separati, è possibile analizzarli. L'analisi viene effettuata rilevando la luce che ogni nucleotide emette, poiché la luce emessa da ogni tipo di nucleotide è unica.

**Analisi bioinformatica:** Allineamento con residui in banca dati