



IL DNA ricombinante



Storia del DNA ricombinante



Struttura del DNA da Francis e Crick



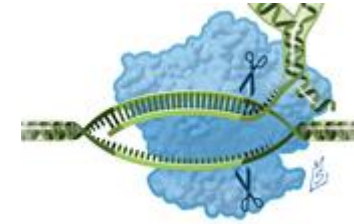
Sequenziamento Sanger e di Maxam e Gilbert



Scoperta degli enzimi di restrizione



PCR di Kary Mullis



CRISPR/Cas



Illumina next generation sequencing

1953

1977

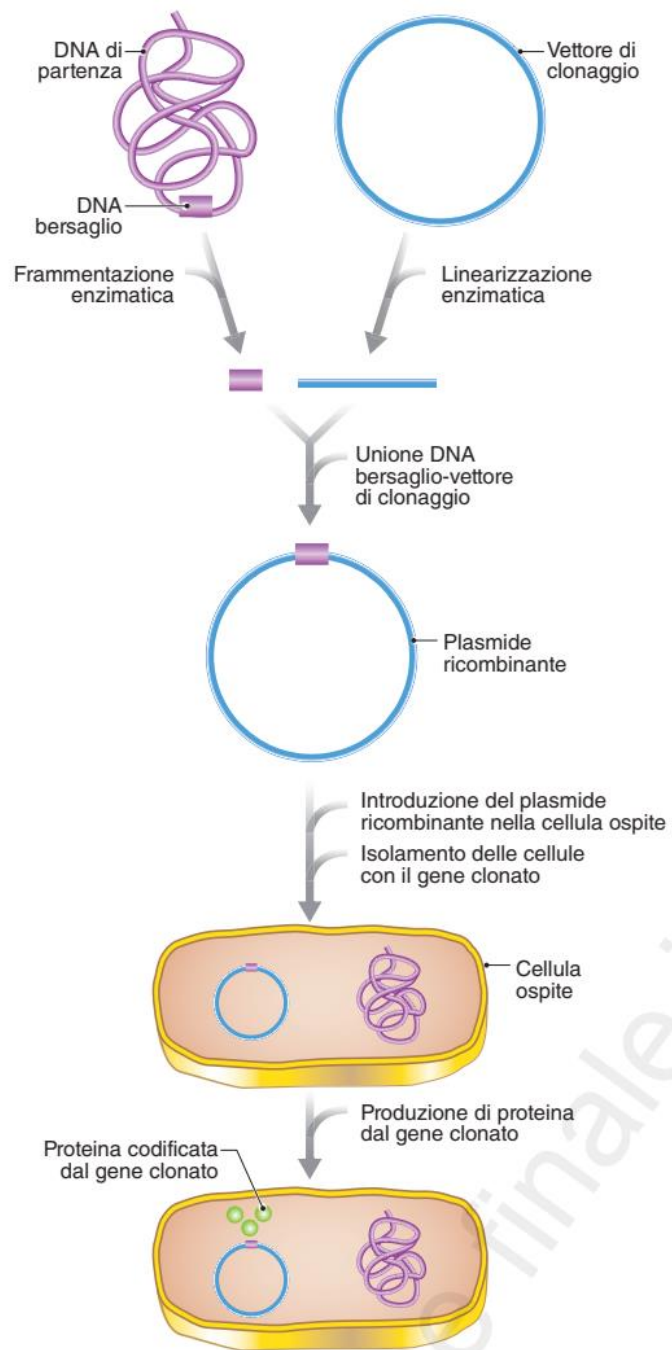
1978

1983

2005

2007

Il clonaggio

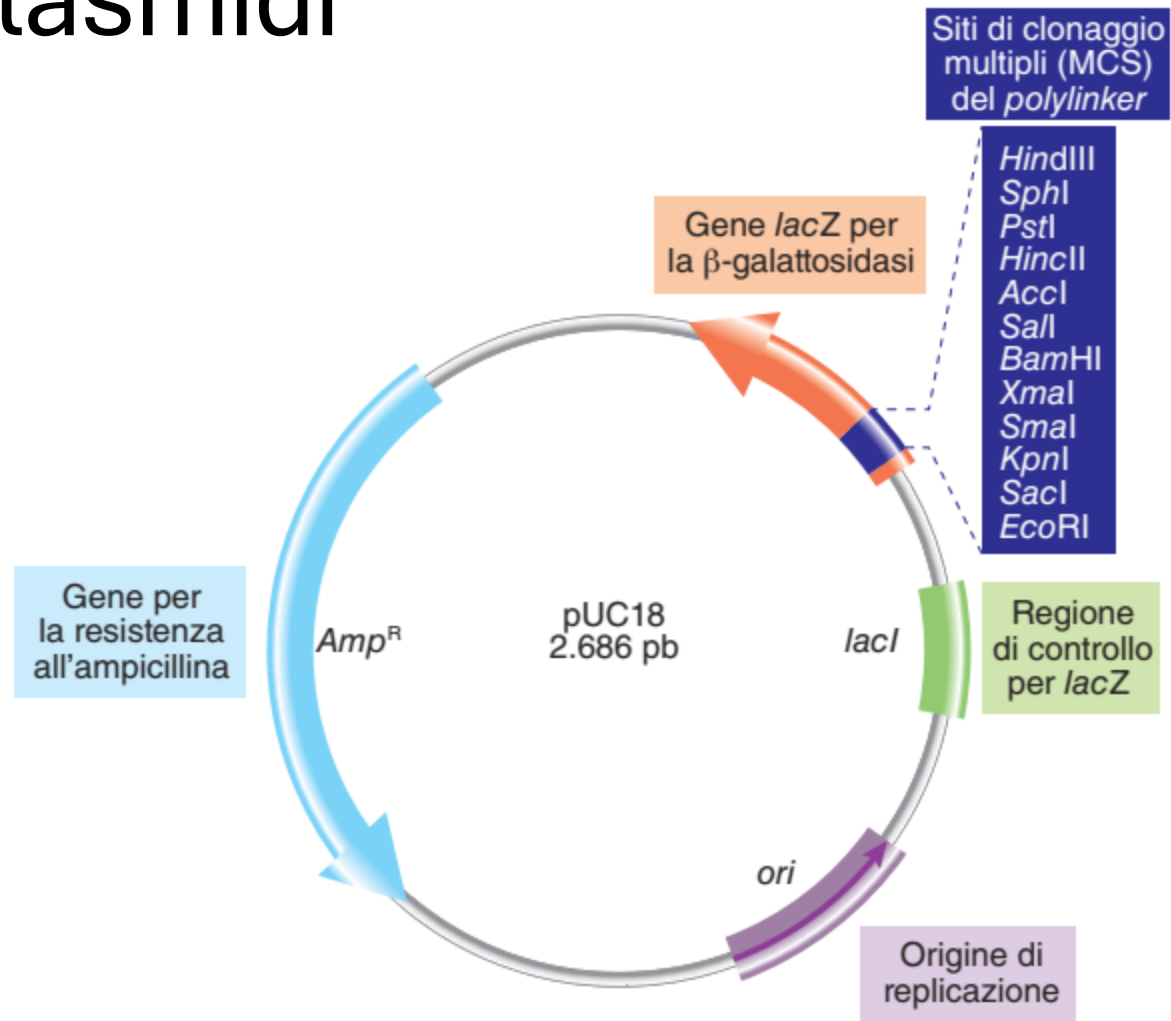


Il clonaggio è una tecnica che permette di produrre copie identiche di un frammento di DNA utilizzando un vettore. Si tratta di un insieme di metodi sperimentali nella biologia molecolare che consente di ottenere più copie di una determinata sequenza nucleotidica

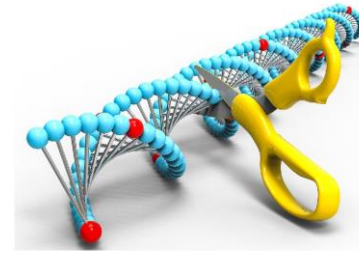
Qui il gene diventa realmente un clone in quanto amplificato in molte copie (500-600 copie per batterio per i plasmidi moderni)

FIGURA 20.1 ► Rappresentazione schematica di un esperimento di clonaggio genico.

I vettori: plasmidi



Gli enzimi di restrizione



Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith ricevettero nel 1978 il Premio Nobel per la Medicina “per la scoperta degli enzimi di restrizione e la loro applicazione a problemi di genetica molecolare”, quando notarono che quando in un ceppo del batterio *Escherichia coli* si introduceva del DNA proveniente da un ceppo diverso, questo DNA veniva tagliato in frammenti.

Lo stesso accade quando i batteri vengono infettati da un virus: la crescita del virus veniva perciò detta *ristretta*, tramite questo sistema immunitario primitivo, mentre i siti di taglio sul genoma batterico sono protetti via metilazione del DNA.

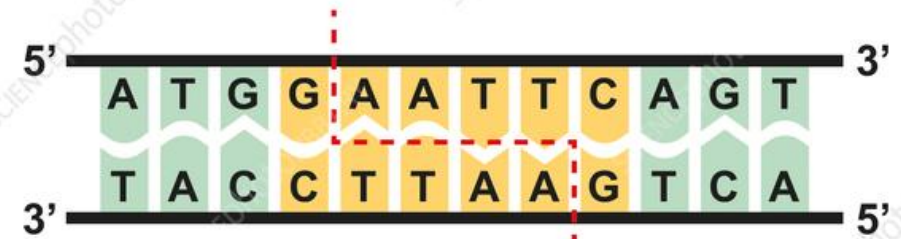
I siti palindromici vengono tagliati: *e.g.* per *ecoRI*

5'-AGATCT-3'
3'-TCTAGA-5'

diventa

5'-A-3'OH 5'-GATCT-3'
3'-TCTAG-5'HO3'-A-5'

EcoRI Enzyme Restriction Site



Alcuni enzimi generano estremita' protrudenti, altri piatte

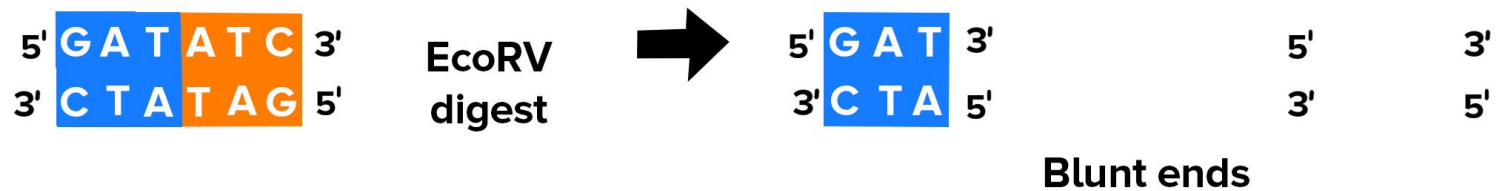
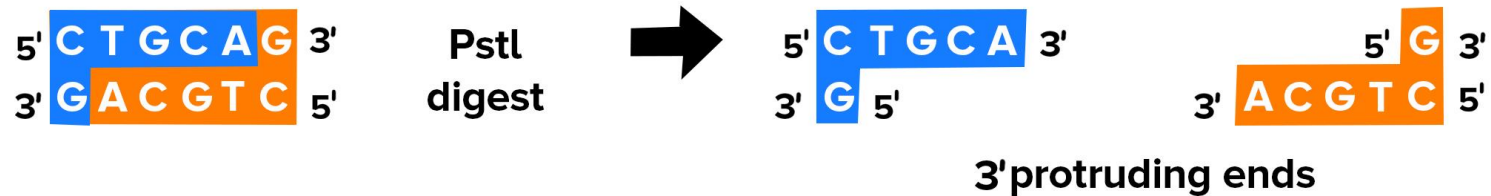
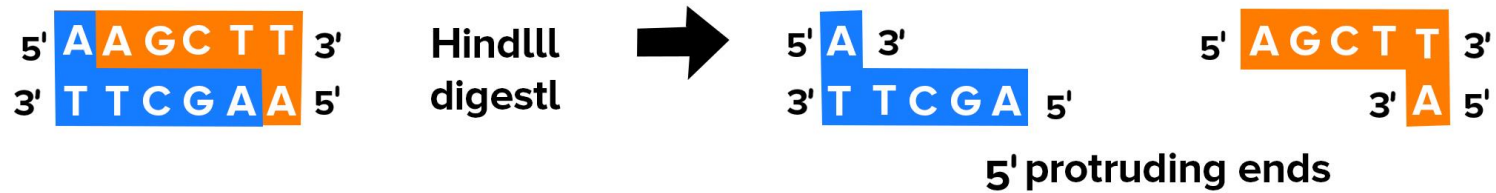
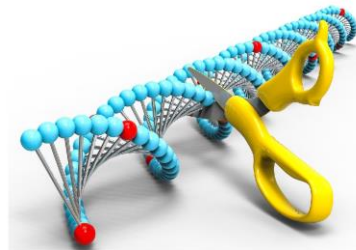


Tabella 20.1 Enzimi di restrizione più utilizzati, sequenze riconosciute e sito di taglio (indicato dalla freccia verticale)

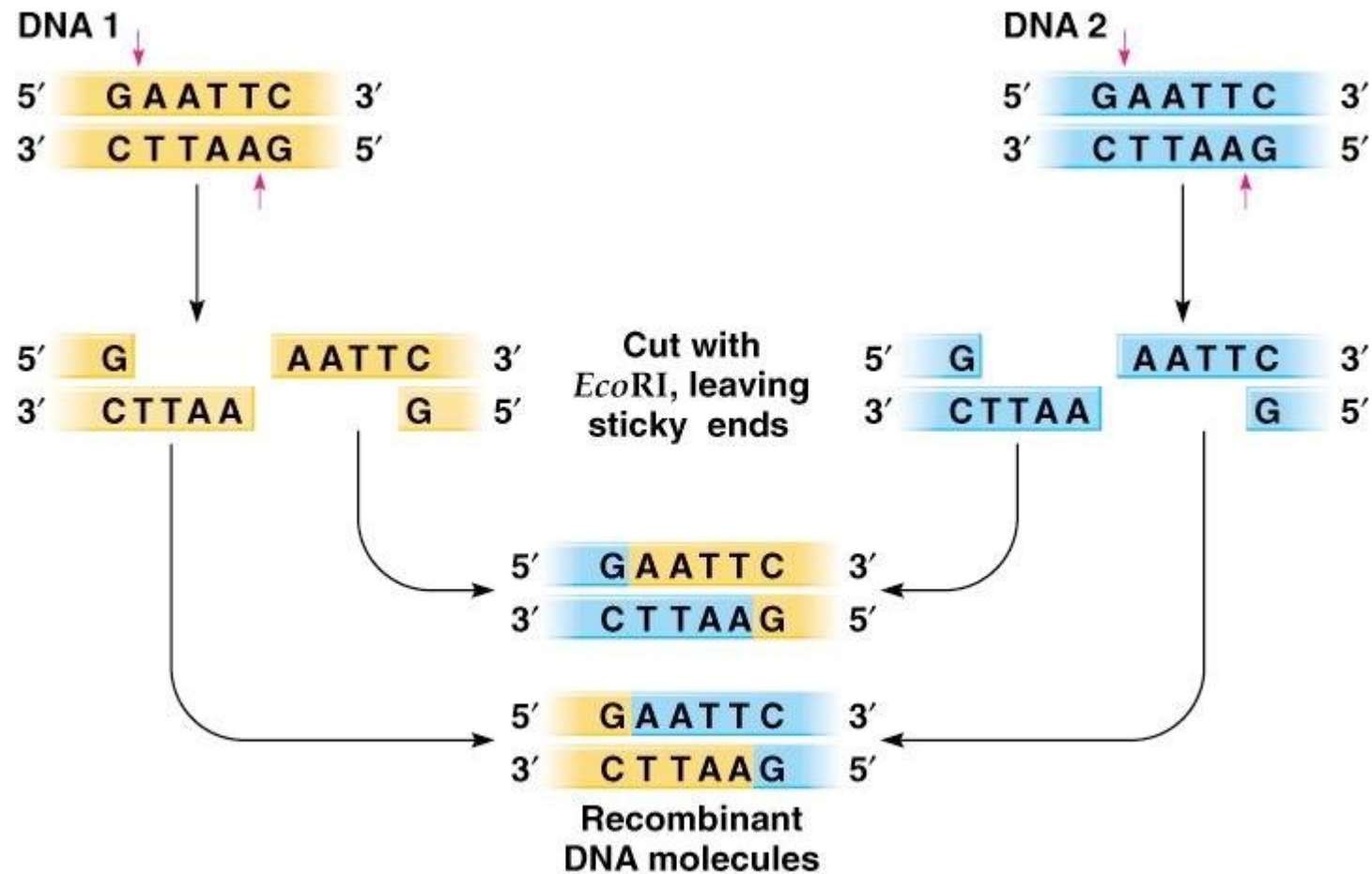
Nome dell'enzima	Sequenza riconosciuta e sito di taglio	Tipo di estremità generate	Filamento protrudente
<i>Bam</i> HI	↓ 5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5' ↑	Coesive	5'
<i>Eco</i> RI	↓ 5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5' ↑	Coesive	5'
<i>Hind</i> III	↓ 5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5' ↑	Coesive	5'
<i>Sal</i> I	↓ 5'-GTCGAC-3' 3'-CAGCTG-5' ↑	Coesive	5'
<i>Sau</i> 3AI	↓ 5'-GATC-3' 3'-CTAG-5' ↑	Coesive	5'
<i>Hha</i> I	↓ 5'-GCGC-3' 3'-CGCG-5' ↑	Coesive	3'
<i>Pst</i> I	↓ 5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5' ↑	Coesive	3'
<i>Alu</i> I	↓ 5'-AGCT-3' 3'-TCGA-5' ↑	Piatte	
<i>Hae</i> III	↓ 5'-GGCC-3' 3'-CCGG-5' ↑	Piatte	
<i>Sma</i> I	↓ 5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5' ↑	Piatte	

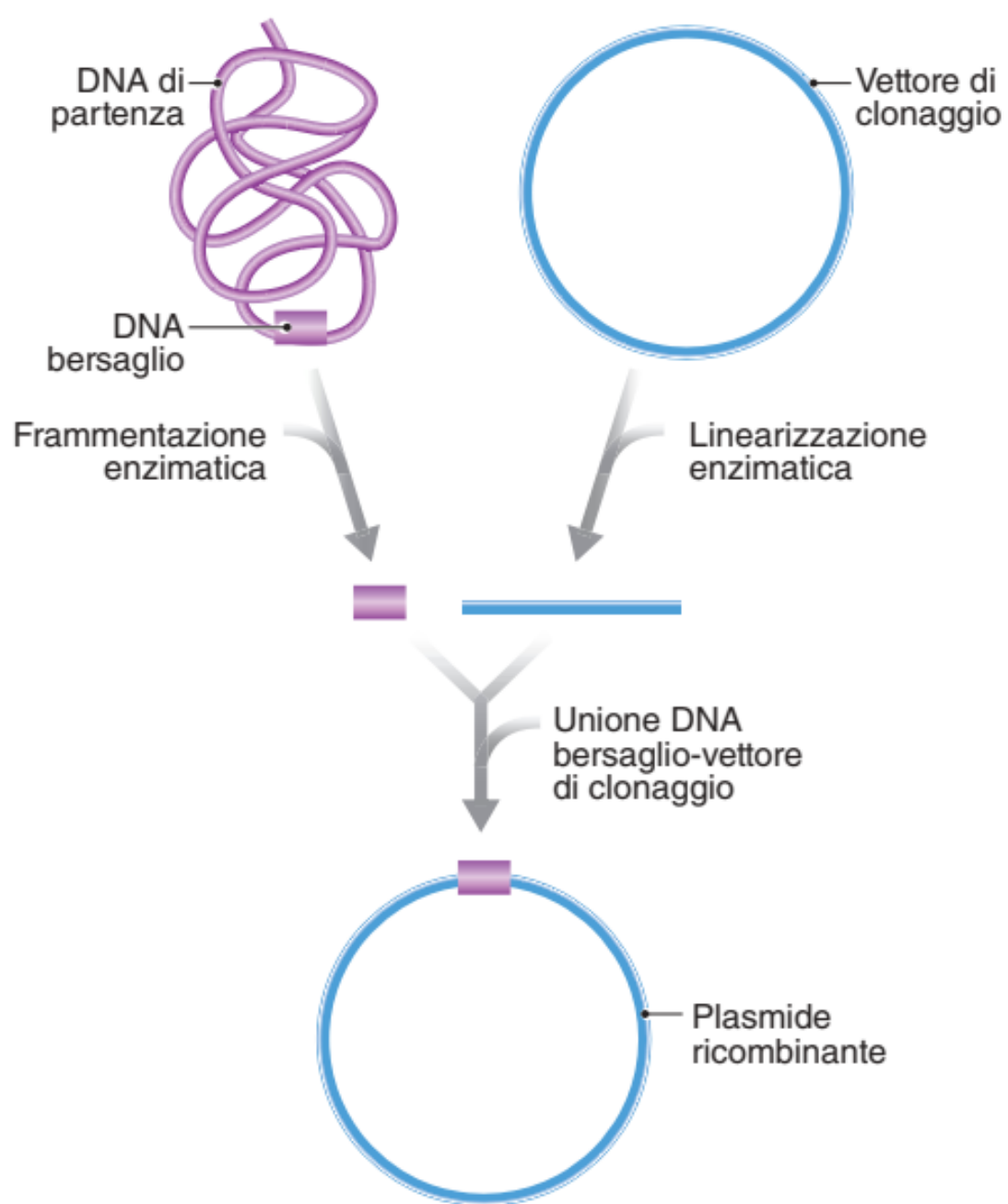
Gli enzimi di restrizione possono tagliare in più punti del genoma

- Nel caso di un DNA con uguali percentuali di AT e GC, una sequenza di 4 basi comparirà con una frequenza di $\frac{1}{4}^4$, quindi in media ogni 256 paia di basi
- Una di 6 basi con una frequenza di $\frac{1}{4}^6$, quindi in media ogni 4096 paia di basi, e così via (PS: errato sul libro).
- Una di 8 basi con una frequenza di $\frac{1}{4}^8$, quindi in media ogni 65536 paia di basi, e così via.



Copia e incolla di regioni tagliate tramite ligasi





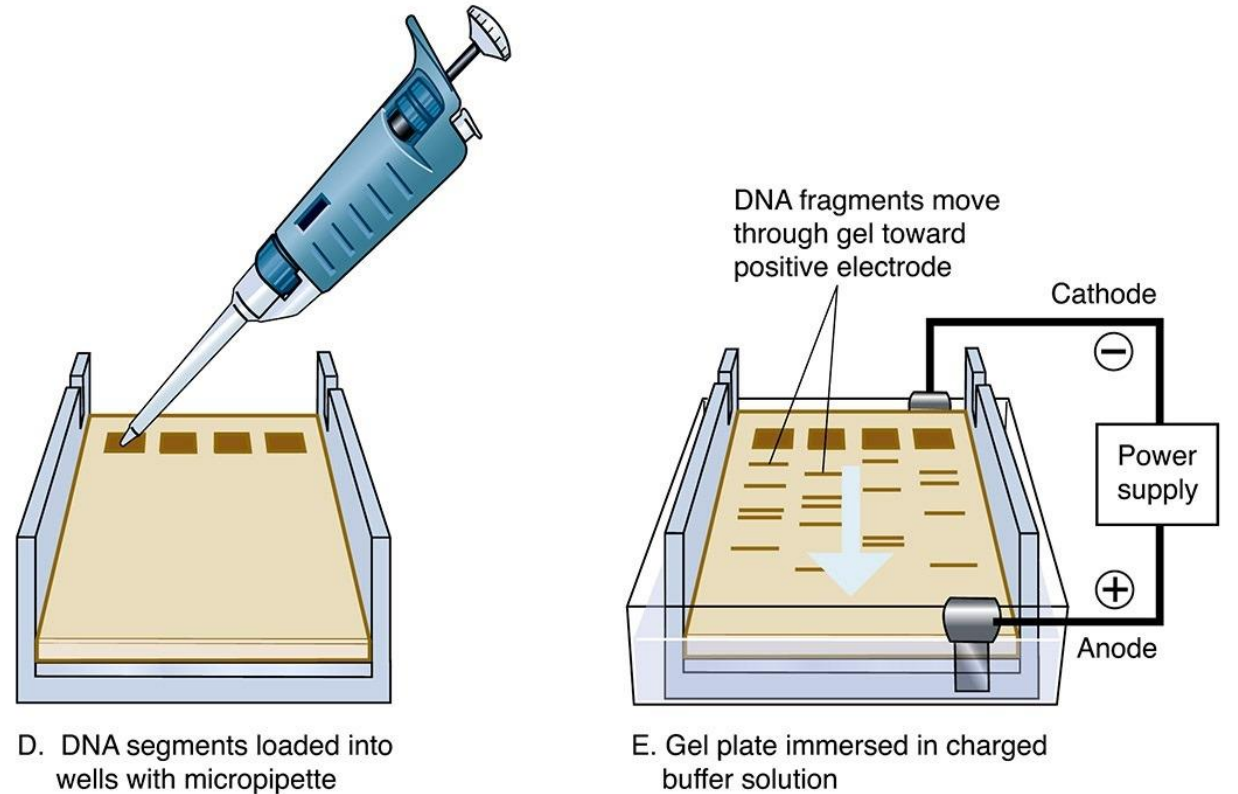
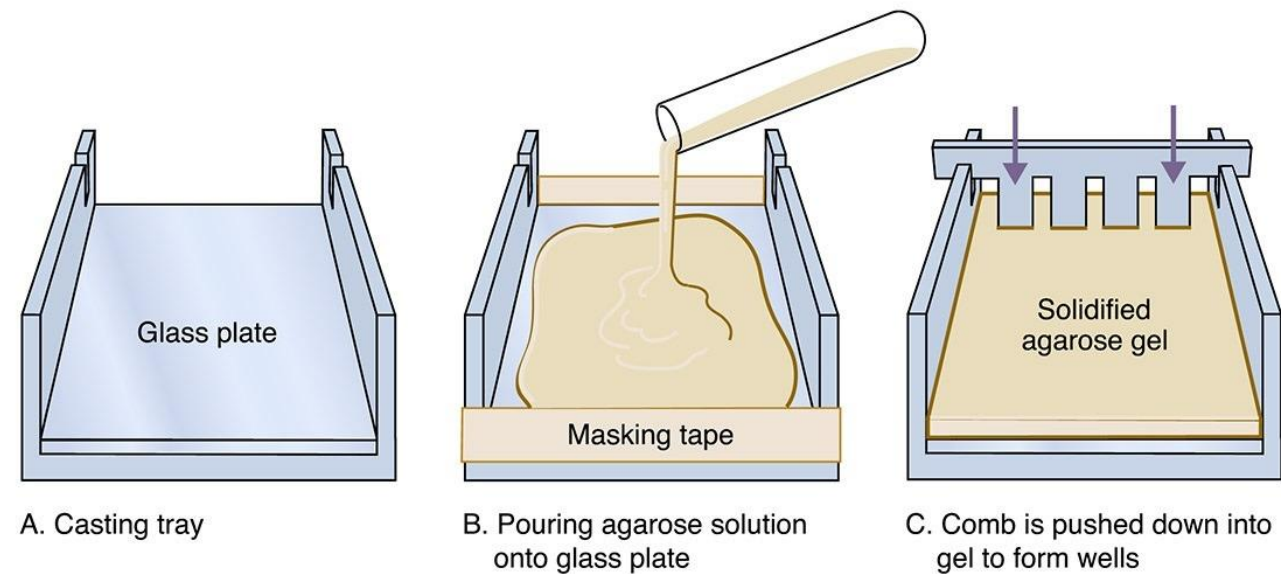
Clonaggio

Step 1: taglio del plasmide e del DNA target via enzimi di restrizione

Step 2: Ligazione con ligasi per inserire il DNA target nel vettore

Elettroforesi

- Gel di agarosio o di acrilamide per maggior risoluzione
- Il DNA migra in base alla struttura (plasmidi circolarizzati CCC, open-circular con solo un filament tagliato OC o DNA linearizzato L) e al peso molecolare
- Il DNA e' visualizzato tramite bromuro di etidio, che fluoresce se esposto a UV



Elettroforesi

- Gel di agarosio o di acrilamide per maggior risoluzione
- Il DNA migra in base alla struttura (plasmidi circolarizzati CCC, open-circular con solo un filament tagliato OC o DNA linearizzato L) e al peso molecolare
- Il DNA e' visualizzato tramite bromuro di etidio, che fluoresce se esposto a UV

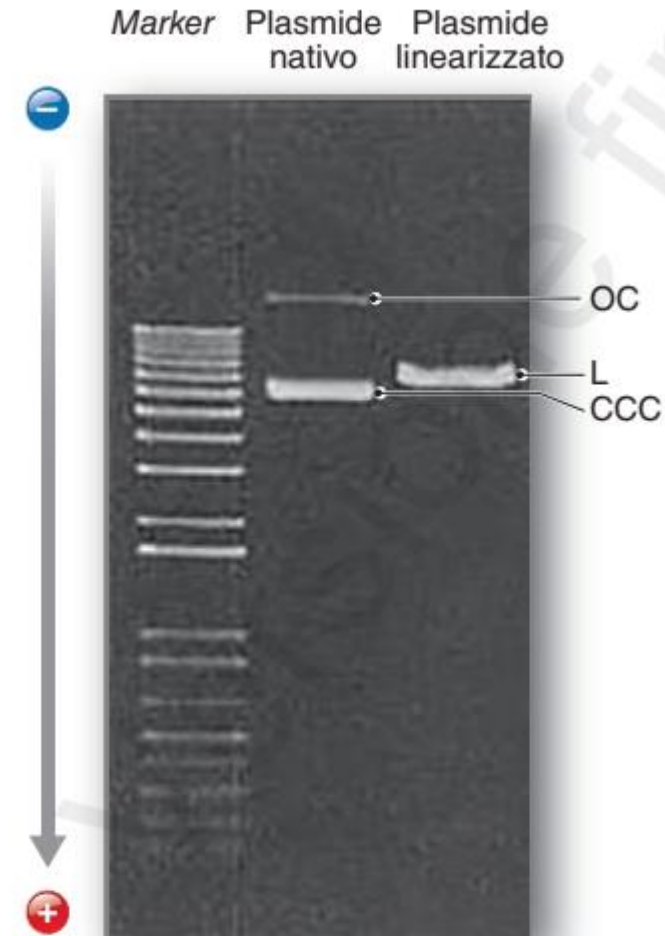
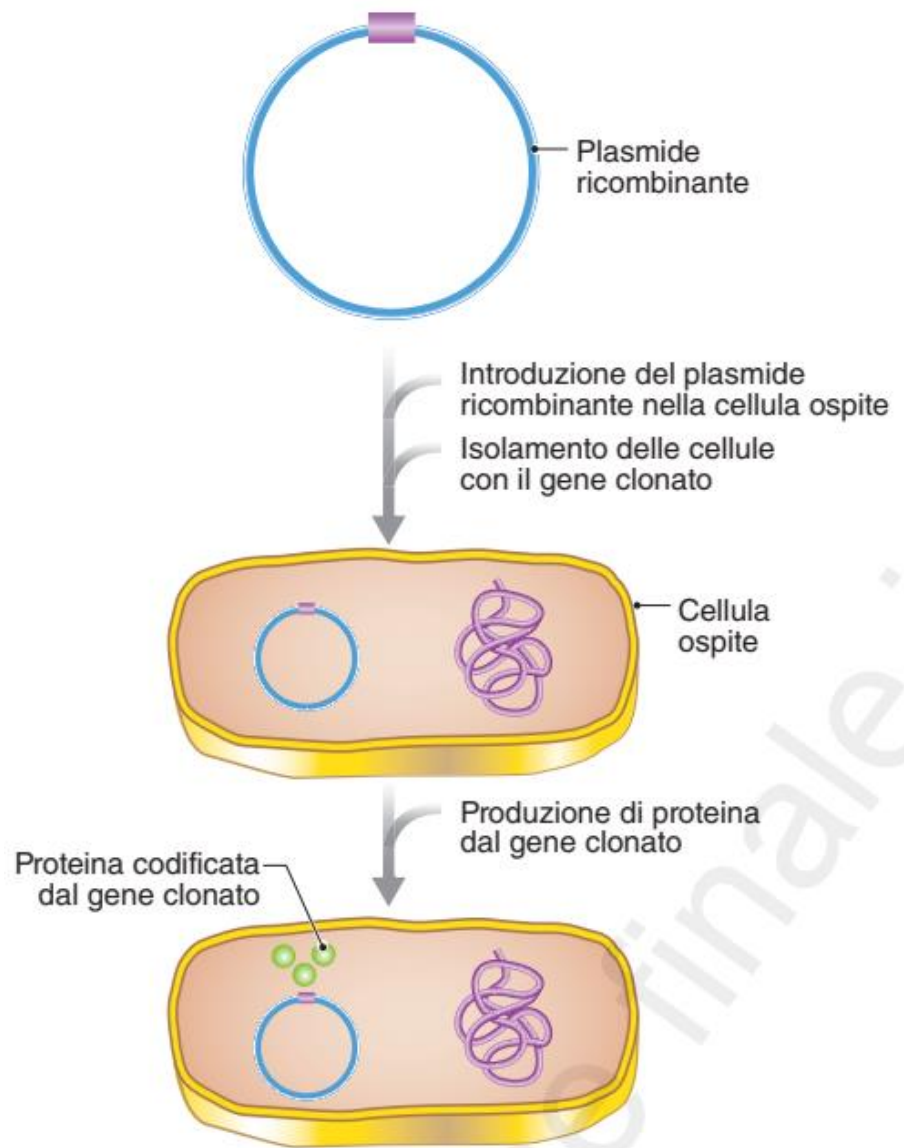


FIGURA 20.3 ▶ Elettroforesi su gel di agarosio di DNA plasmidico trattato con un enzima di restrizione che linearizza il plasmide tagliandolo in un unico punto della molecola. Abbreviazioni: OC, Open Circular; CCC, Circular Covalently Closed; L, Linear. Marker: frammenti di DNA di dimensione nota.



FIGURA 20.4 ► Elettroforesi su gel di agarosio di DNA genomico trattato con un enzima di restrizione. Separazione elettroforetica di un campione di DNA che non è stato digerito con l'enzima di restrizione (nativo) e di un analogo campione dopo digestione. Si può osservare che in entrambi i casi è presente uno *smear*, causato dalla presenza di molecole di DNA di dimensioni diverse, ma nel campione digerito le bande hanno dimensioni ridotte rispetto al campione nativo. *Marker*: frammenti di DNA di dimensione nota.

Clonaggio



Libreria di plasmidi

Step 1: taglio del plasmide e del DNA target via enzimi di restrizione

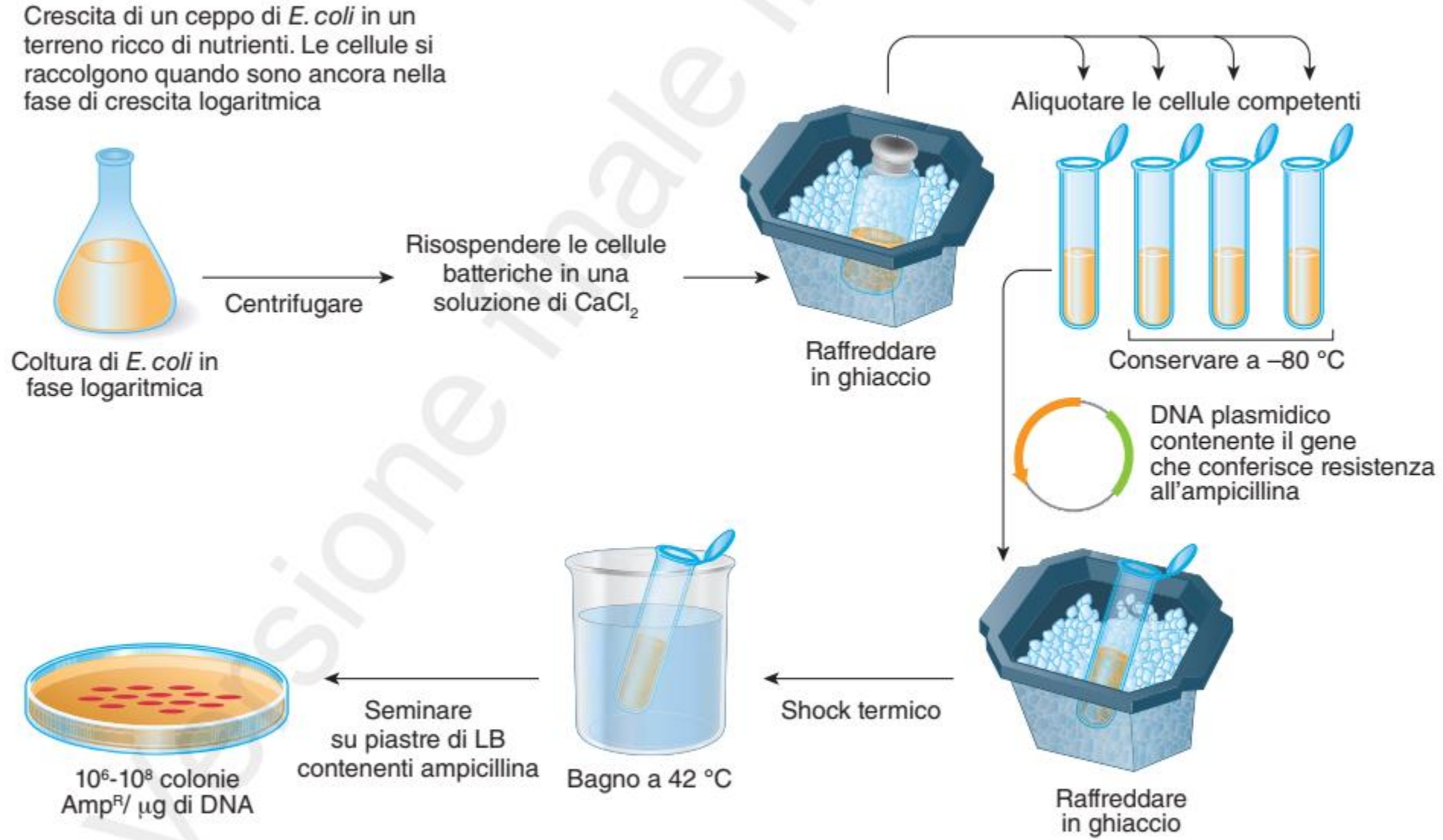
Step 2: Ligazione con ligasi per inserire il DNA target nel vettore

Step 3: Trasformazione del vettore

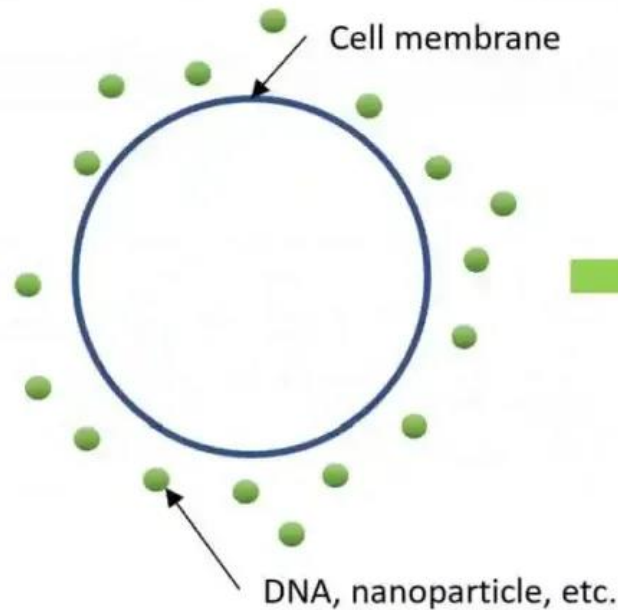
Le cellule batteriche possono incorporare il DNA esogeno solamente quando si trovano in un particolare stato, detto di "competenza". Alcuni batteri, come *B. subtilis*, sono naturalmente trasformabili, in quanto possiedono dei geni (detti *com*, per *competenza*)

La grande maggioranza dei batteri, compreso *E. coli*, usatissimo per il clonaggio, non è naturalmente trasformabile e, quindi, la competenza deve essere indotta artificialmente.

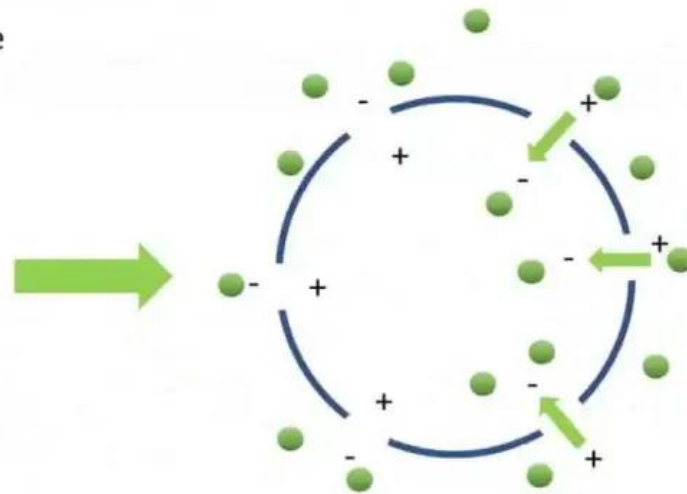
Trasformazione con shock termico



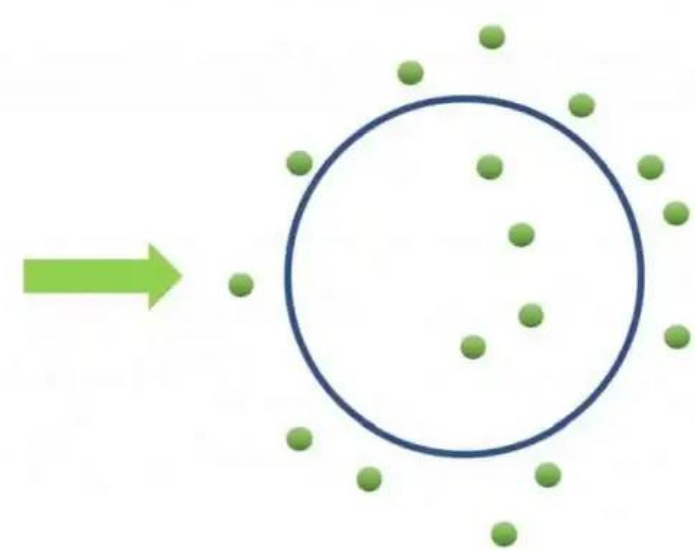
Trasformazione con elettroporazione



Material is introduced to the fluid around the cell.

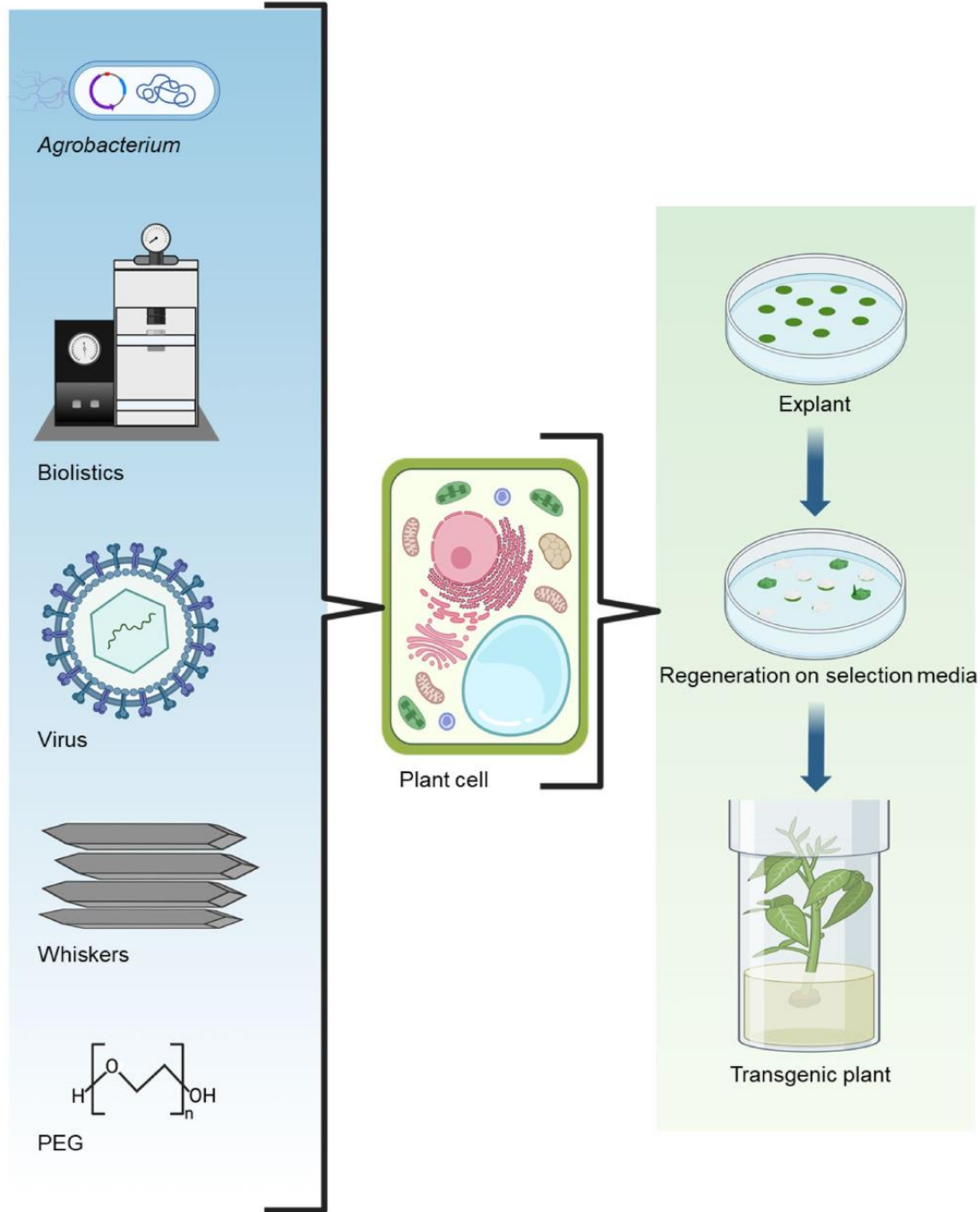


Pulsed power generates an electric field that opens pores in the cell membrane, and material is introduced.

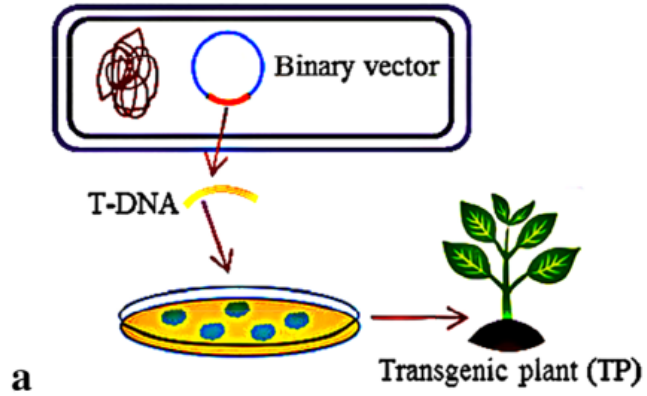


Once the pulse ends, the pores reseal, and the material remains inside the cell.

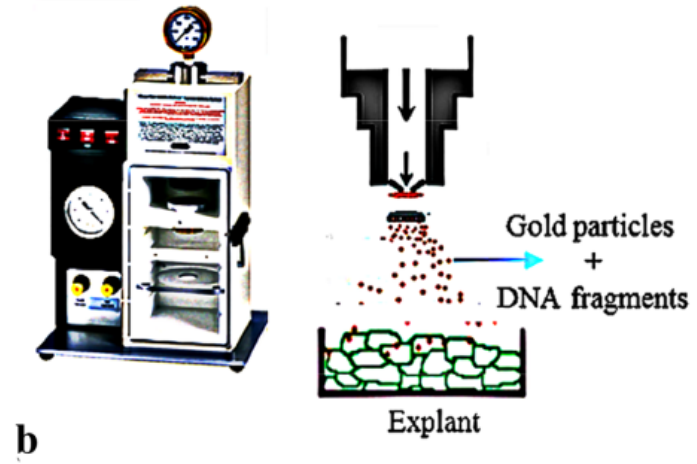
Delivery Systems



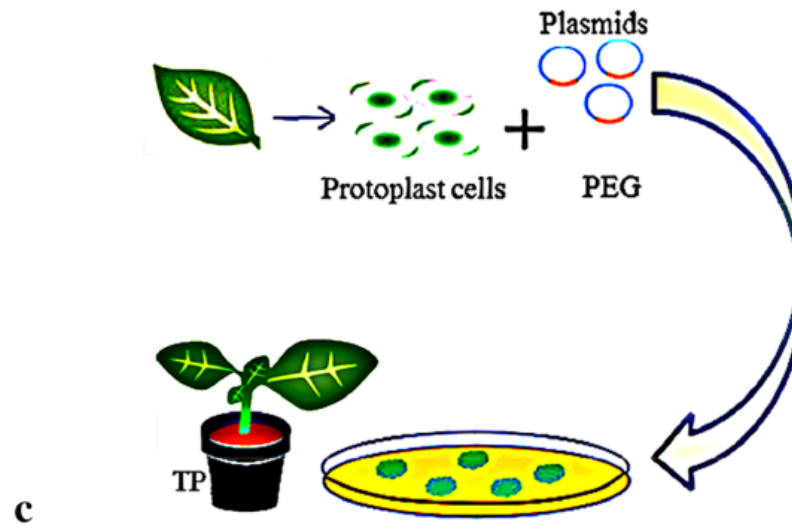
Agrobacterium mediated transformation



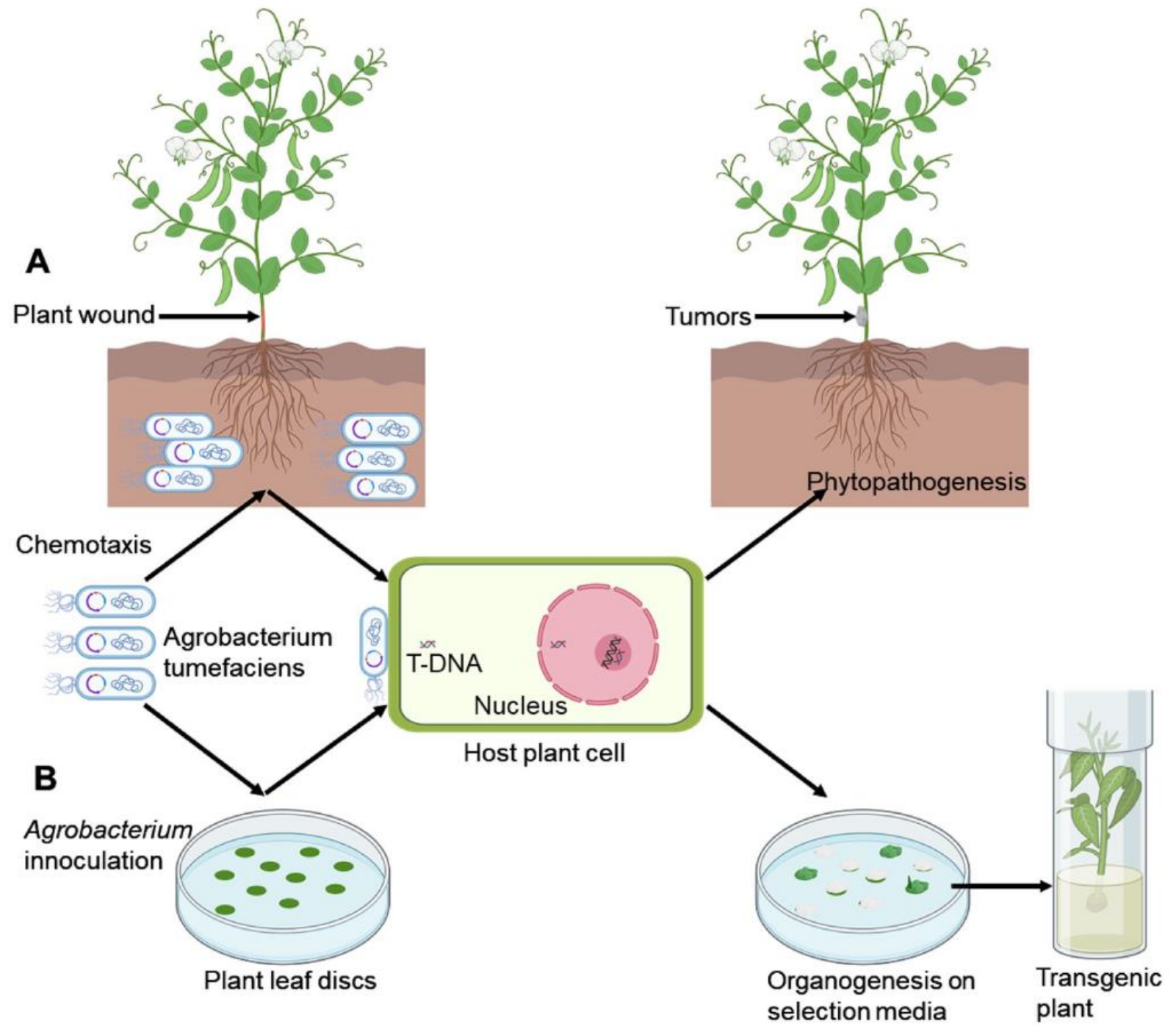
Biolistic transformation



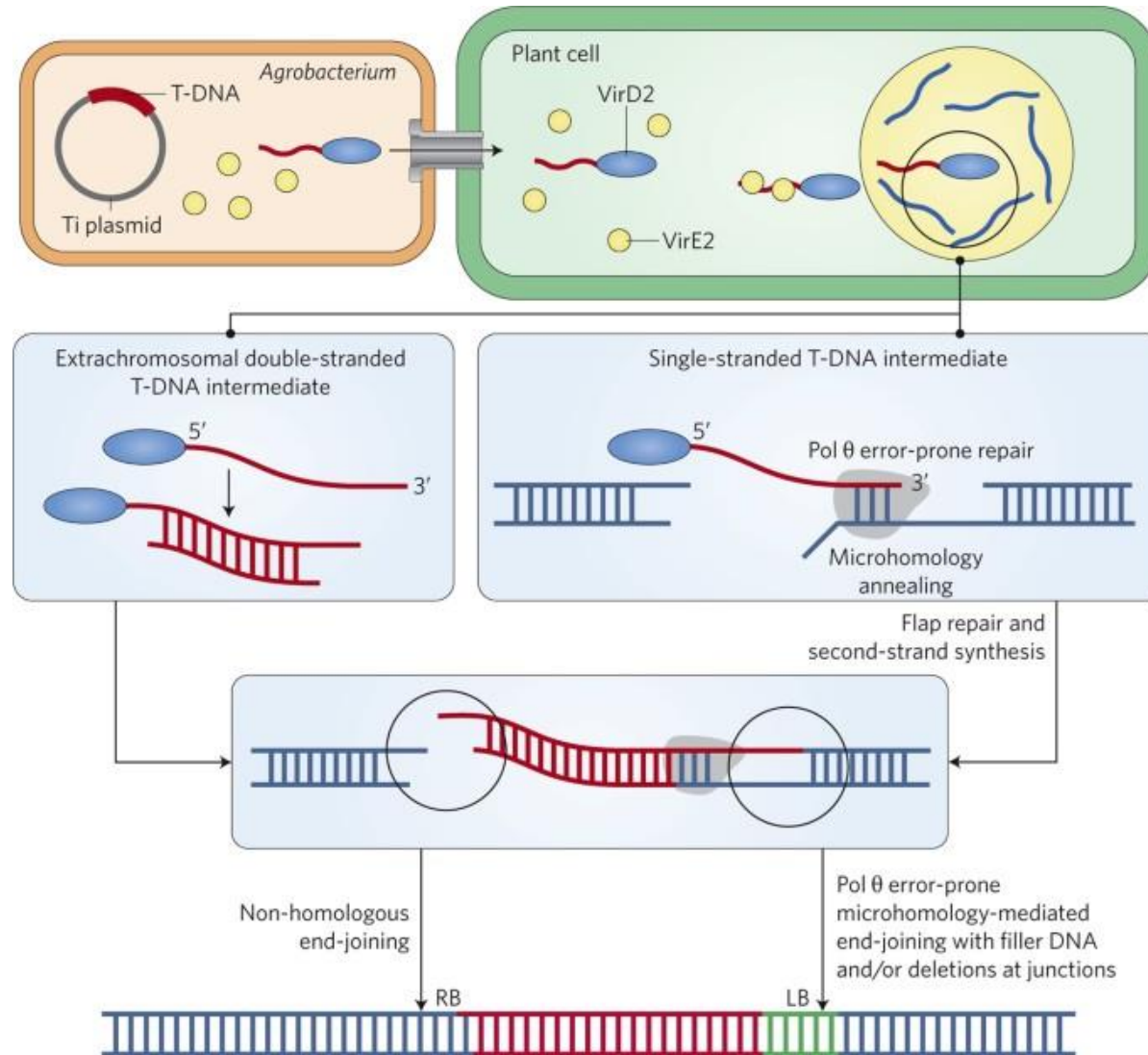
PEG-mediated transformation



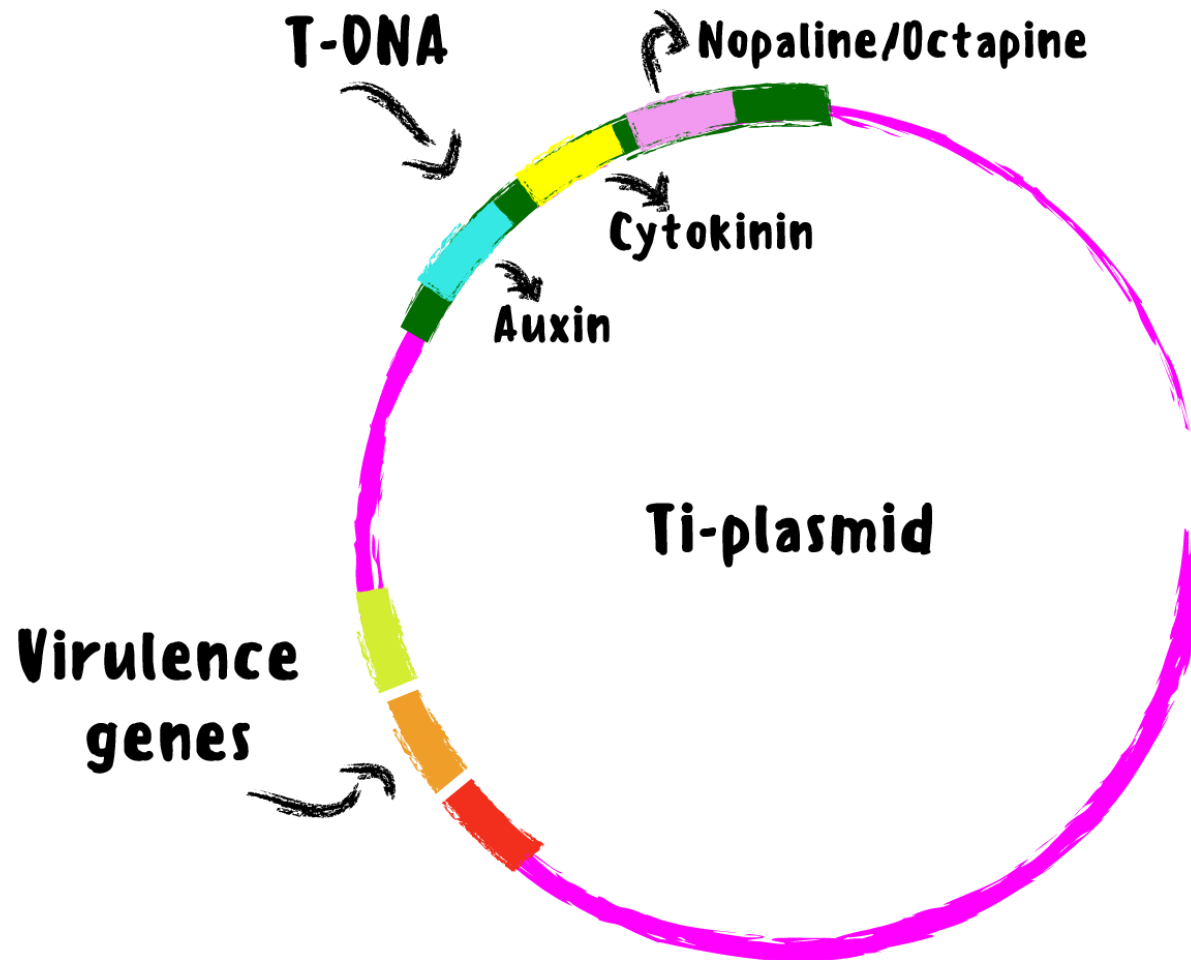
Possiamo usare le caratteristiche patogeniche di *Agrobacterium* per la trasformazione di piante (e non solo)



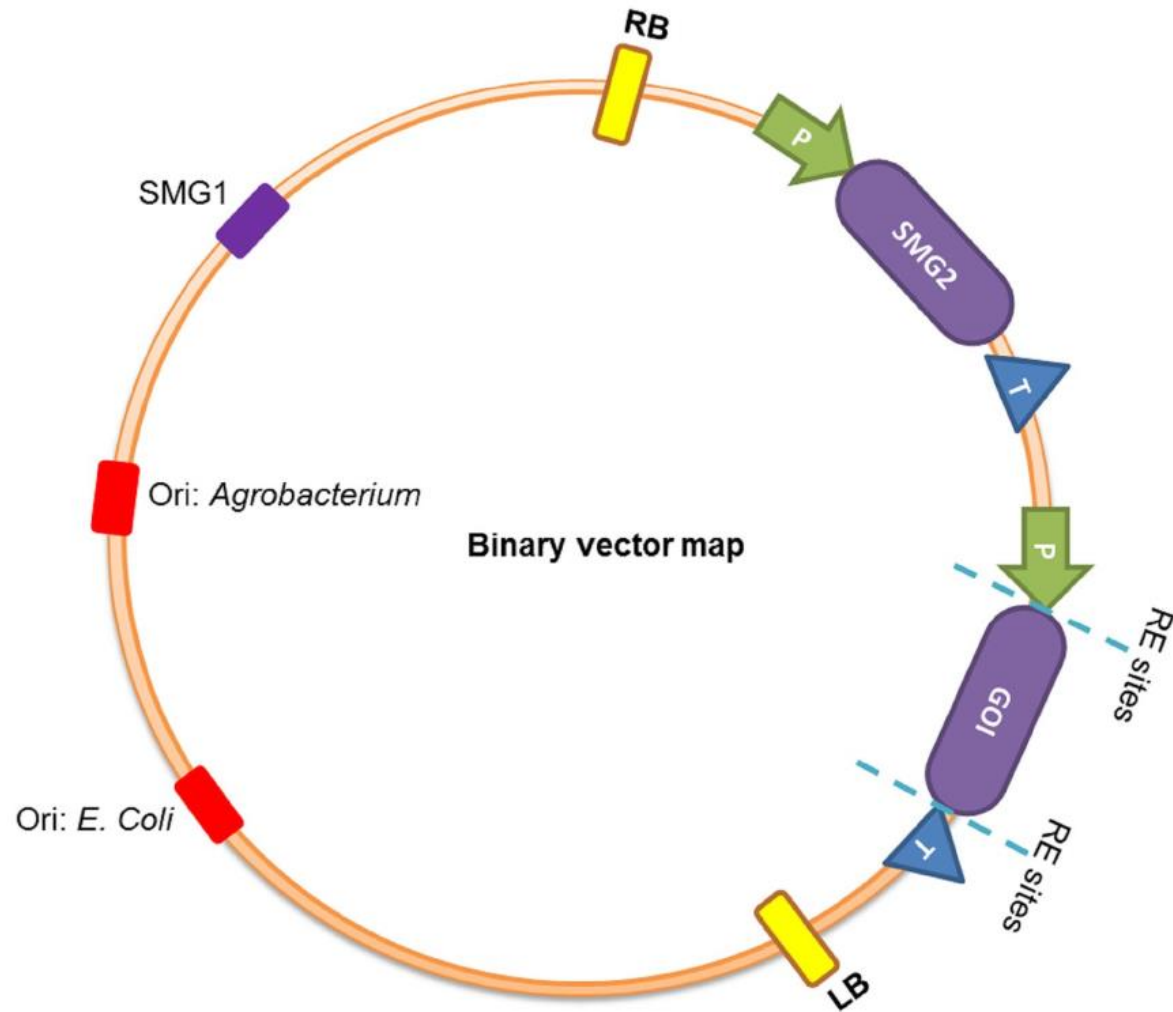
Integrazione del T-DNA



I plasmidi naturali di *Agrobacterium* sono larghi (200kb) e contengono molti geni “inutili”



I ricercatori hanno ingegnerizzato piccoli (11kb) plasmidi utili per il clonaggio



In natura *Agrobacterium* infetta le dicotiledoni..

...ma in laboratorio



E molte altre specie

Table 1 Agronomically important crops transformed with *Agrobacterium*

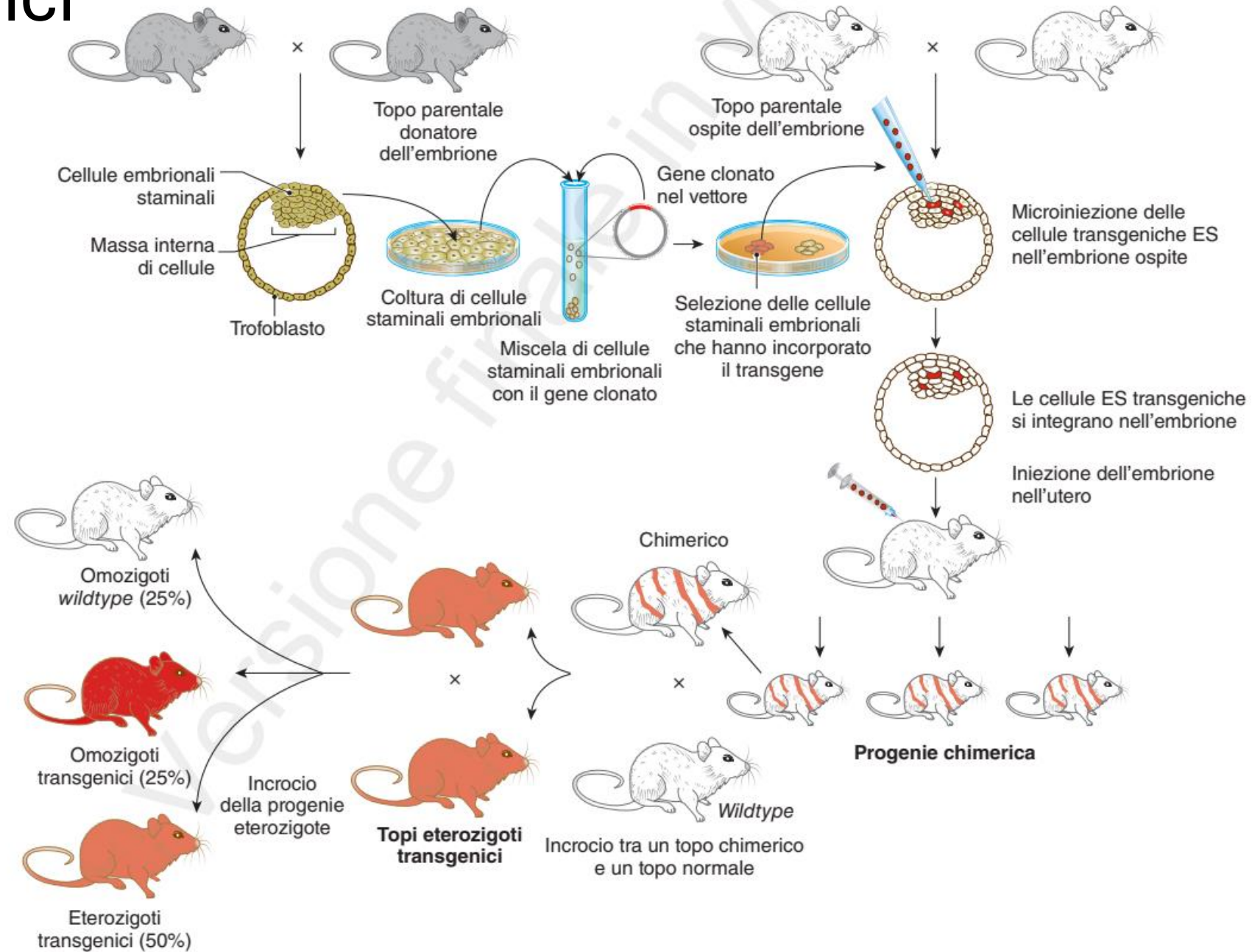
Crop	Gene of interest (GI)	Gene Source	Trait/s	Product (s)	Reference
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	<i>S4-HrA</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi	Herbicide tolerance (Sulfonylurea)	Acetolactate Synthase (ALS)	https://www.isaaa.org/gmapproval/database/
	<i>cryIF</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1F delta-endotoxin	
	<i>cryIAC</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki strain HD	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1Ac delta-endotoxin	
	<i>cryIAC</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki strain HD73	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1Ac delta-endotoxin	
	<i>bxn</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Ozaenae</i>	Herbicide tolerance (Oxynil)	Nitrilase	
	<i>aad-12</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	Herbicide tolerance (2,4-D)	Aryloxyalkanoate di-oxygenase 12 (AAD-12)	
	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Herbicide tolerance (Glufosinate)	Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)	
	<i>vip3A(a)</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88	Insect resistance (Lepidoptera)	Vegetative Insecticidal Protein 3A (vip3A)	
	<i>cryIAb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1Ab delta-endotoxin	
	<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbicide tolerance (Glufosinate)	Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)	
	<i>cry2Ae</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Dakota</i>	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry2Ae delta-endotoxin	
	<i>2mepsps</i>	<i>Zea mays</i>	Herbicide tolerance (Glyphosate)	5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase	
	<i>hppd</i> PF W336	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain A32	Herbicide tolerance (Isoxaflutole)	Modified p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (hppd)	
	<i>cryIaAb-Ac</i>	Synthetic fusion gene derived from <i>Bacillus thuringiensis</i>	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1AAb-Ac delta-endotoxin (fusion protein)	
	<i>cryIC</i>	Synthetic gene derived from <i>Bacillus thuringiensis</i>	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1C delta-endotoxin	
	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	Herbicide tolerance (Glyphosate)	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)	
	<i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain DI-6	Herbicide tolerance (Dicamba)	Dicamba monooxygenase (DMO)	
	<i>dCS</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Low Gossypol	Silence endogenous d-cadinene synthase (dCS)	
<i>Brassica napus</i>	<i>te</i>	<i>Umbellularia californica</i> (bay leaf)	Modified oil/fatty acid	12:0 ACP thioesterase enzyme	
	<i>Lackl-delta12D</i>	<i>Lachancea kluyveri</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-12-desaturase	

Table 1 (continued)

Crop	Gene of interest (GI)	Gene Source	Trait/s	Product (s)	Reference
	<i>Picpa-omega-3D</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-15-/omega-3-desaturase	
	<i>Micpu-delta-6D</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-6-desaturase	
	<i>Pyrco-delta-6E</i>	<i>Pyramimonas cordata</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-6-elongase	
	<i>Pavsa-delta-5D</i>	<i>Pavlova salina</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-5-desaturase	
	<i>Pyrco-delta-5E</i>	<i>Pyramimonas cordata</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-5-elongase	
	<i>Pavsa-delta-4D</i>	<i>Pavlova salina</i>	Modified oil/fatty acid	Delta-4-desaturase	
	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Herbicide tolerance (Glufosinate)	Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)	
	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	Herbicide tolerance (Glyphosate)	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)	
	<i>goxx247</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i> strain LBAA	Herbicide tolerance (Glyphosate)	Glyphosate oxidase	
	<i>pat (syn)</i>	Synthetic pat gene derived from <i>Streptomyces viridochromogenes</i> strain Tu 494	Herbicide tolerance (Glufosinate)	Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)	
	<i>phyA</i>	<i>Aspergillus niger</i> var. van Tieghem	Phytase production	3-Phytase	
	<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbicide tolerance (Glufosinate)	Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)	
	<i>barnase</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Male sterility	Barnase ribonuclease (RNAse)	
	<i>barstar</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fertility restoration	Barnase ribonuclease inhibitor	
	<i>bxn</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Ozaenae</i>	Herbicide tolerance (Oxynil)	Nitrilase	
<i>Triticum aestivum</i>	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	Herbicide tolerance (Glyphosate)	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)	
<i>Saccharum sp</i>	<i>EcBetaA</i>	<i>Escherichia coli</i>	Drought stress tolerance	Choline dehydrogenase	
	<i>RmBetaA</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	Drought stress tolerance	Choline dehydrogenase	
<i>Glycine max</i> L.	<i>aad-12</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	Herbicide tolerance (2,4-D)	Aryloxyalkanoate di-oxygenase 12 (AAD-12)	
	<i>2mepsps</i>	<i>Zea mays</i>	Herbicide tolerance (Glyphosate)	5-Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase enzyme	
	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Herbicide tolerance (Glufosinate)	Phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)	
	<i>aad-12</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	Herbicide tolerance (2,4-D)	Aryloxyalkanoate di-oxygenase 12 (AAD-12)	
	<i>cryIAC</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki strain HD73	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1Ac delta-endotoxin	
	<i>cryIF</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	Insect resistance (Lepidoptera)	Cry1F delta-endotoxin	

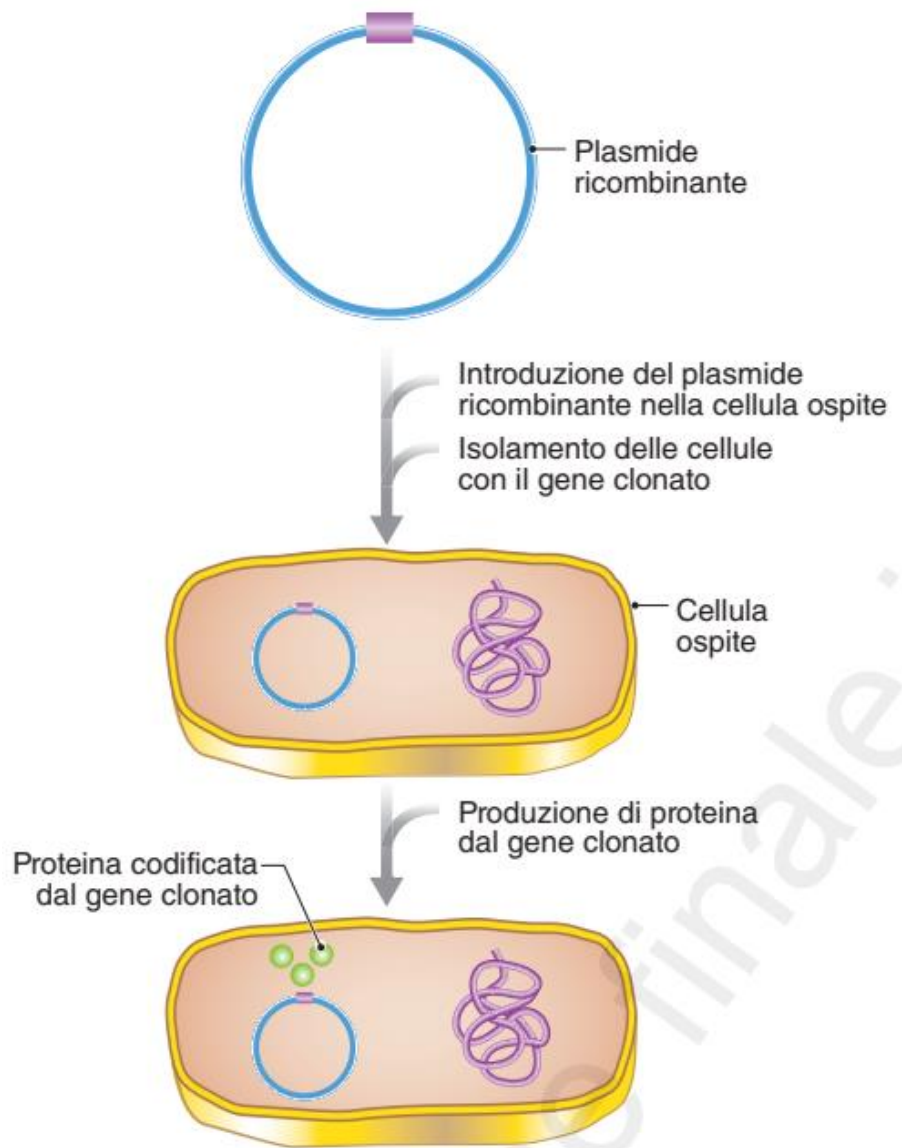
Organismi transgenici

● *



Rappresentazione schematica della "costruzione" di un topo transgenico.

Clonaggio



Libreria di plasmidi

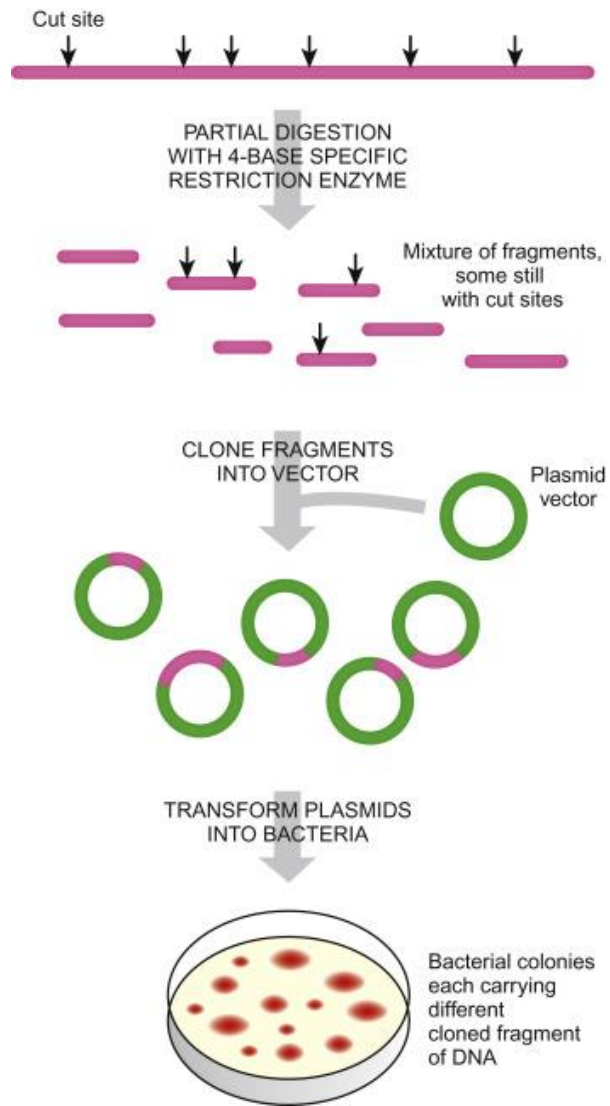
Step 1: taglio del plasmide e del DNA target via enzimi di restrizione

Step 2: Ligazione con ligasi per inserire il DNA target nel vettore

Step 3: Trasformazione del vettore

Le cellule batteriche possono incorporare il DNA esogeno solamente quando si trovano in un particolare stato, detto di "competenza". Alcuni batteri, come *B. subtilis*, sono naturalmente trasformabili, in quanto possiedono dei geni (detti *com*, per *competenza*)

La grande maggioranza dei batteri, compreso *E. coli*, usatissimo per il clonaggio, non è naturalmente trasformabile e, quindi, la competenza deve essere indotta artificialmente.



Screening di una libreria

- Al termine del processo di clonaggio si ottiene una libreria di DNA ricombinante. Per identificare i cloni desiderati:
 - Rivelazione immunologica
 - Complementazione di una mutazione
 - Ibridazione DNA/DNA
 - PCR

Complementazione

- Questo sistema si basa sull'utilizzo di mutanti (es. mutanti auxotrofi, cioè incapaci di sintetizzare un determinato composto).
- **ESEMPIO:** Supponiamo, in questo caso, di voler clonare un gene (Y) che codifica un enzima coinvolto nella biosintesi dell'aminoacido istidina. Se nella banca genomica esiste (almeno) un clone con un plasmide ricombinante contenente il gene Y e se questo gene viene trascritto e tradotto nelle cellule ospiti, la proteina Y si accumula nel citoplasma. Se un ceppo auxotrofo per l'istidina (mutato nel gene Y) viene trasformato con l'intera banca genomica, solamente le cellule che ricevono il plasmide ricombinante contenente il gene Y funzionante saranno capaci di sintetizzare nuovamente e autonomamente l'istidina e saranno perciò le sole cellule capaci di crescere in un terreno minimo privo dell'aminoacido.

LA PCR



Struttura
del DNA
da Francis
e Crick

1953



Sequenziamento
Sanger e di
Maxam e Gilbert

1977



Scoperta
degli
enzimi di
restrizione

1978

PCR di
Kary
Mullis

1983



L'alta temperatura denature separa i due filamenti di DNA

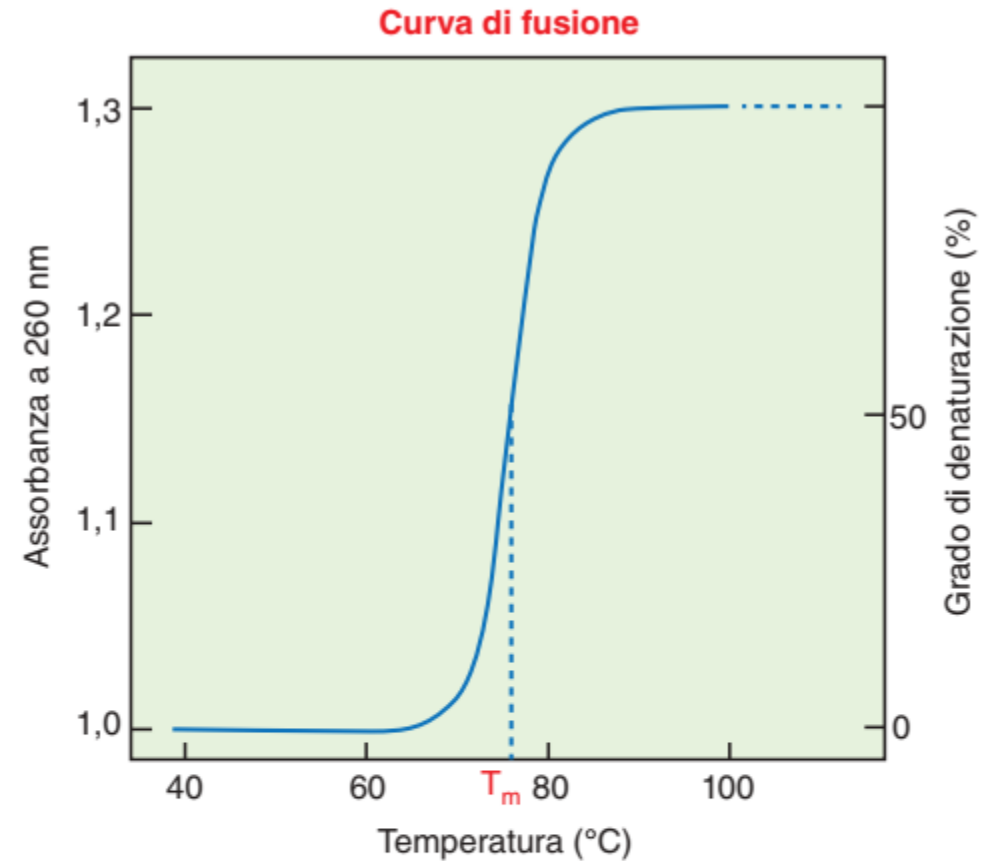


FIGURA 20.8 ► Determinazione della T_m del DNA. Il grado di associazione tra le due eliche può essere misurato dall'assorbanza a 260 nm del DNA in soluzione. Le basi accoppiate e impilate nel DNA a doppia elica assorbono meno a 260 nm di quelle "separate" (effetto ipercromico). All'aumentare della temperatura, le eliche si separano sempre di più, con corrispondente aumento dell'assorbanza a 260 nm. Quanto maggiore è il contenuto in GC del DNA in esame, tanto maggiore sarà la sua temperatura di fusione. Nel caso illustrato, a 76 °C il 50% delle molecole di DNA è denaturato.

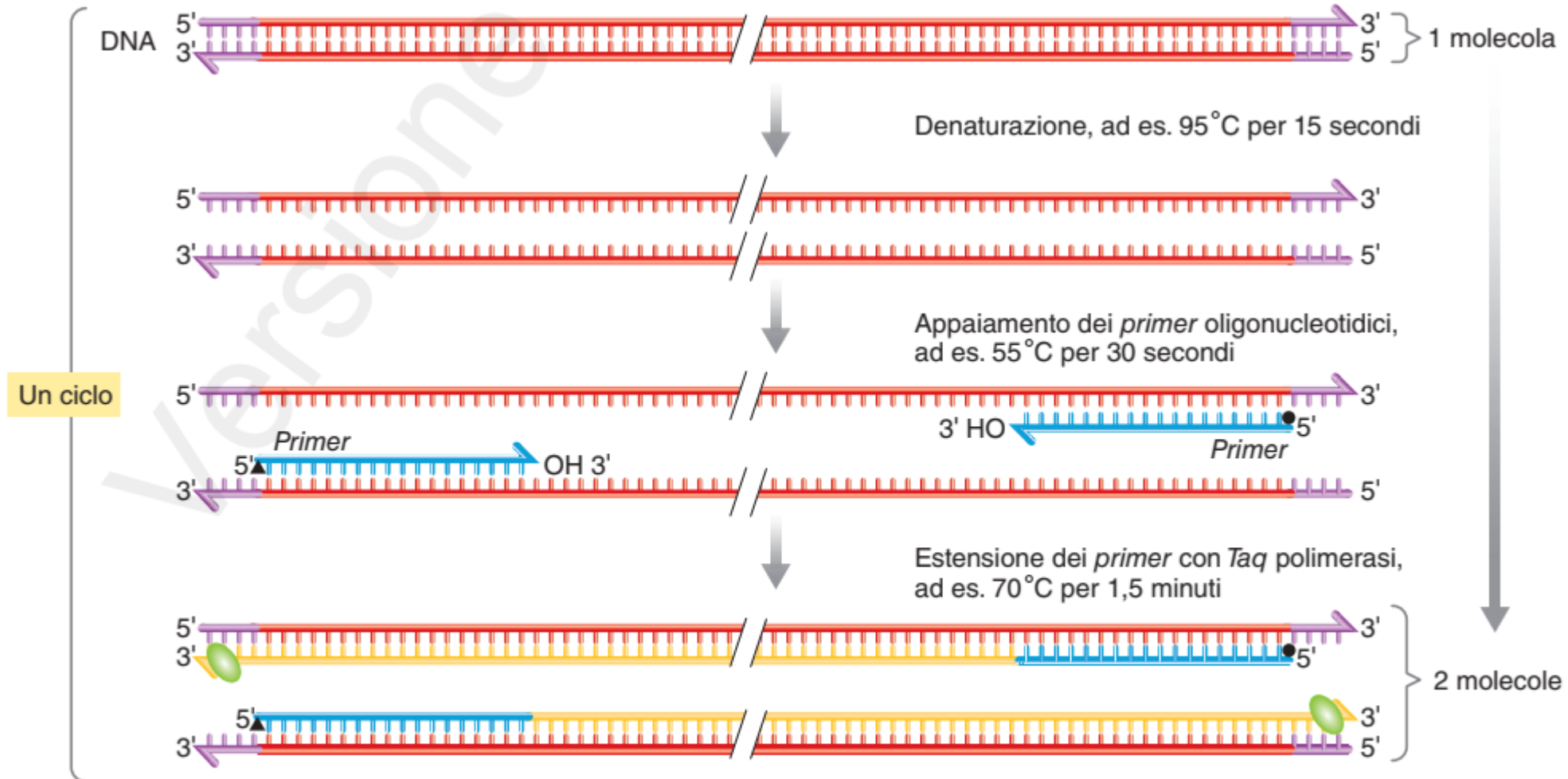
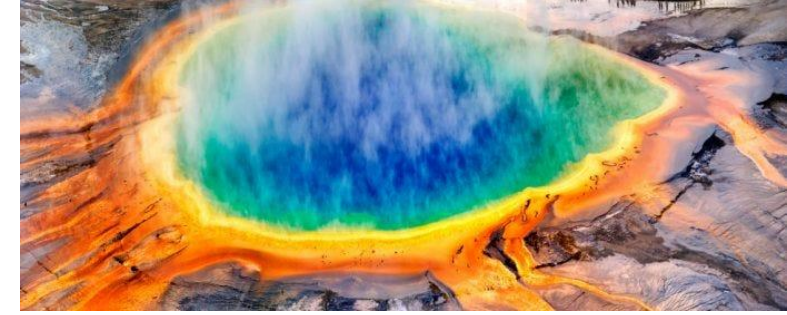


FIGURA 20.9 ▶ Schema riassuntivo della reazione a catena della polimerasi.


Partendo da una molecola di DNA, dopo 4 cicli di amplificazione, quante molecole di DNA avremo?

- A: 4
- B: 8
- C: 16
- D: 64

Partendo da una molecola di DNA, dopo 4 cicli di amplificazione, quante molecole di DNA avremo?

- A: 4

- B: 8

- C: 16 

- D: 64

- Effettivamente nei primi cicli le molecole non sono della lunghezza esatta. Quindi dopo 30 cicli avremo

$$2^{28} = 268.435.456 \text{ molecole!!!!}$$

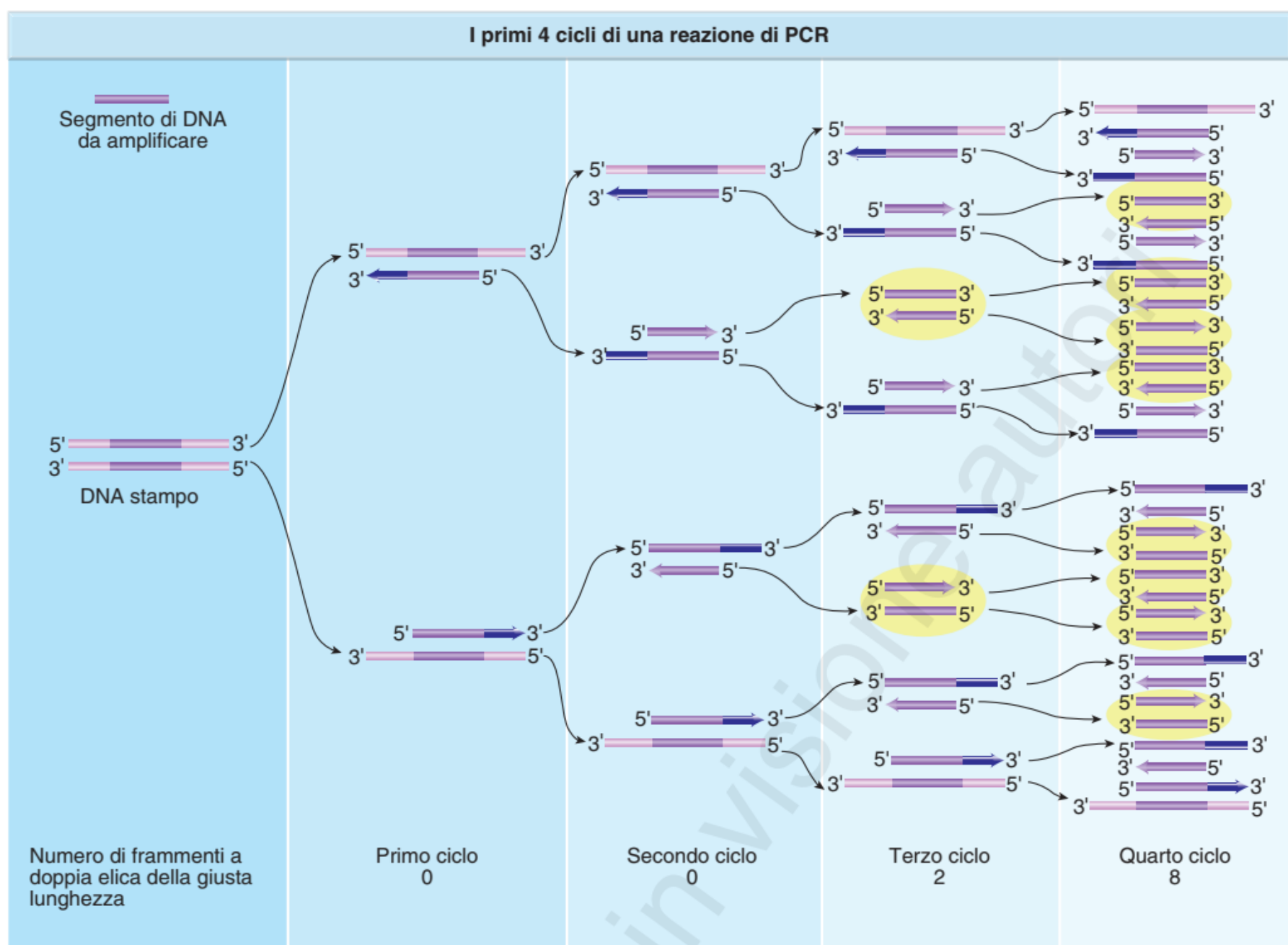


FIGURA 20.10 ► Numero di copie di un frammento di DNA amplificato per PCR a partire da una singola molecola di DNA stampo.

Tipico protocollo di PCR

5 min a 95 °C		(pre-PCR)
35 cicli con il seguente profilo termico:	95 °C per 30 s	denaturazione
	55 °C per 30 s	<i>annealing</i>
	72 °C per 1 min	estensione
72 °C per 10 min		estensione finale
4 °C per ∞		blocco della reazione

La PCR quantitativa puo' essere usata per
“quantificare” il DNA (o l'RNA)

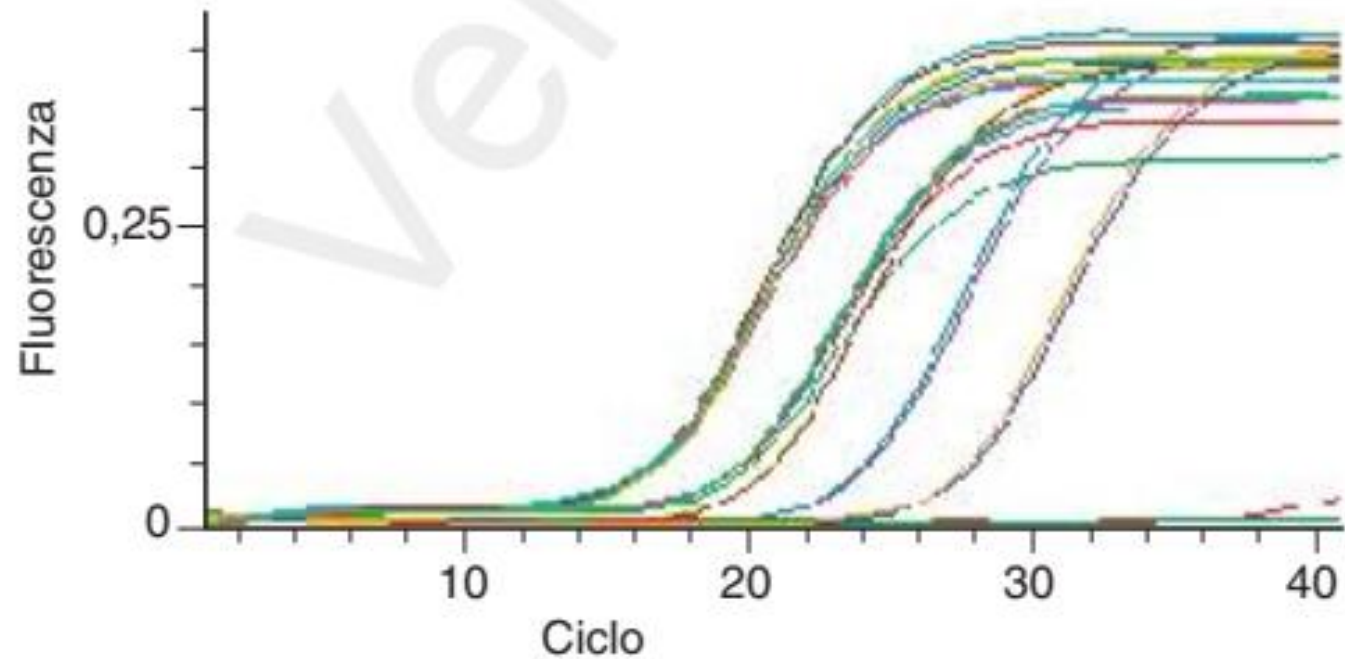
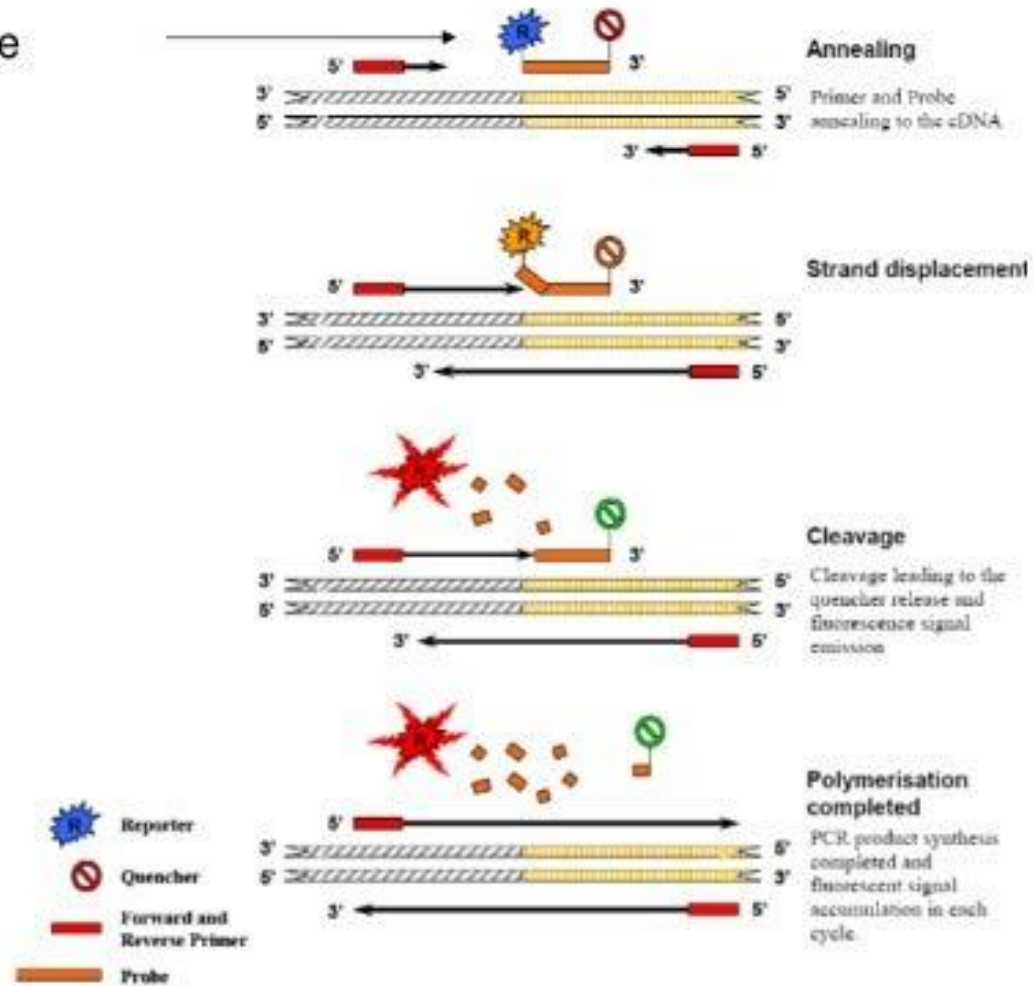


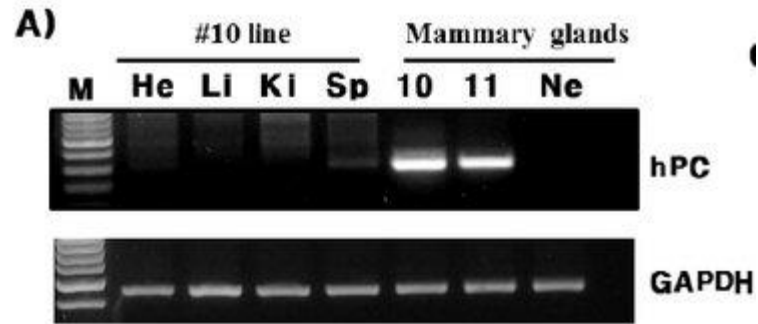
FIGURA 20.12 ► PCR quantitativa. In ordinata è riportato il livello di fluorescenza registrato per ogni campione (ogni linea del grafico) a ogni ciclo (in ascissa).

Quantitative real-time-PCR

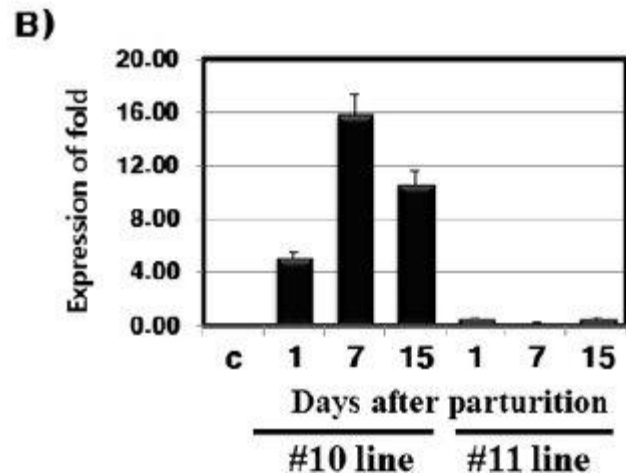
Taqman probe



RT-PCR versus qRT-PCR



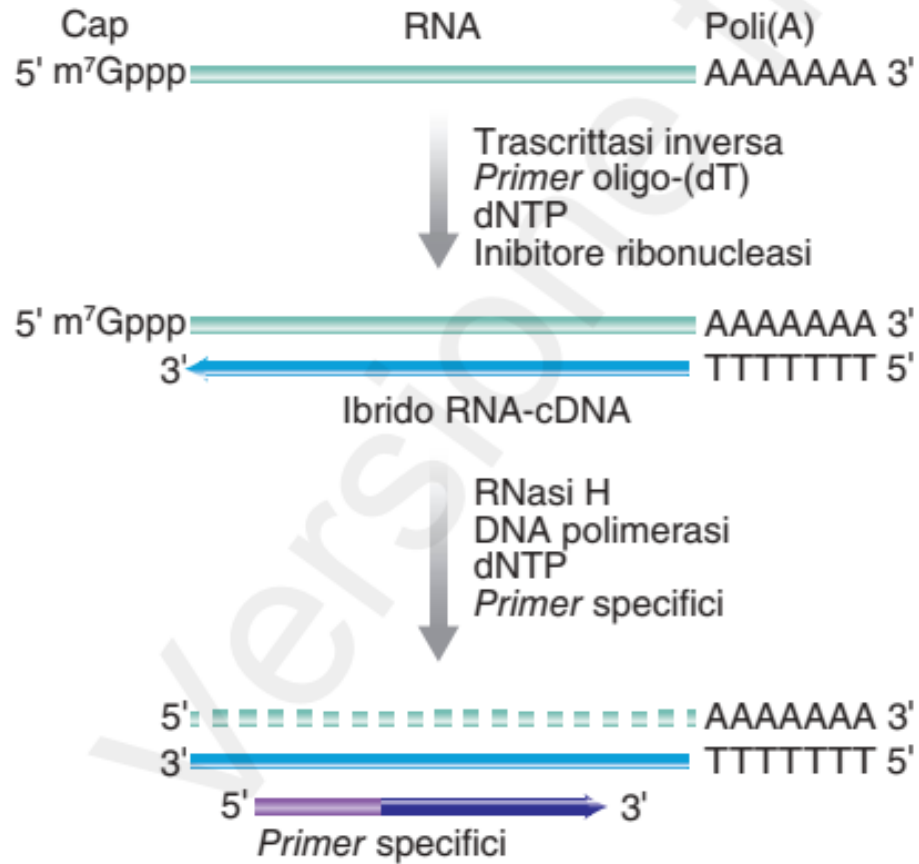
RT-PCR



qRT-PCR

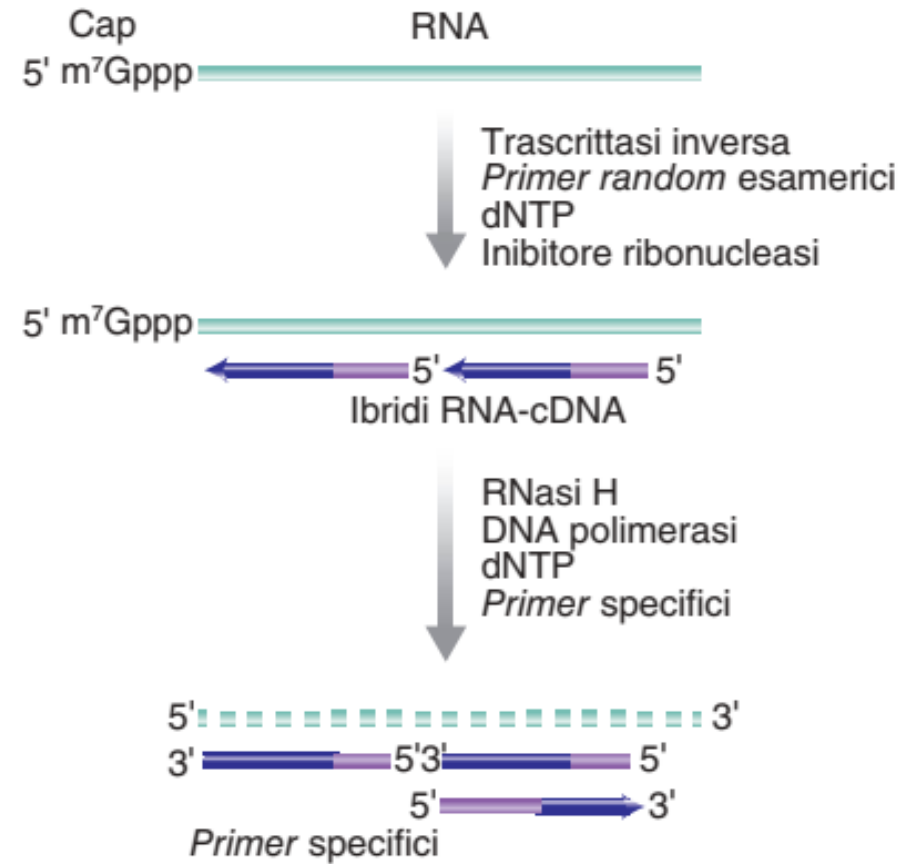
La trascrittasi inversa e permette la quantificazione dell'RNA

Amplificazione degli RNA messaggeri



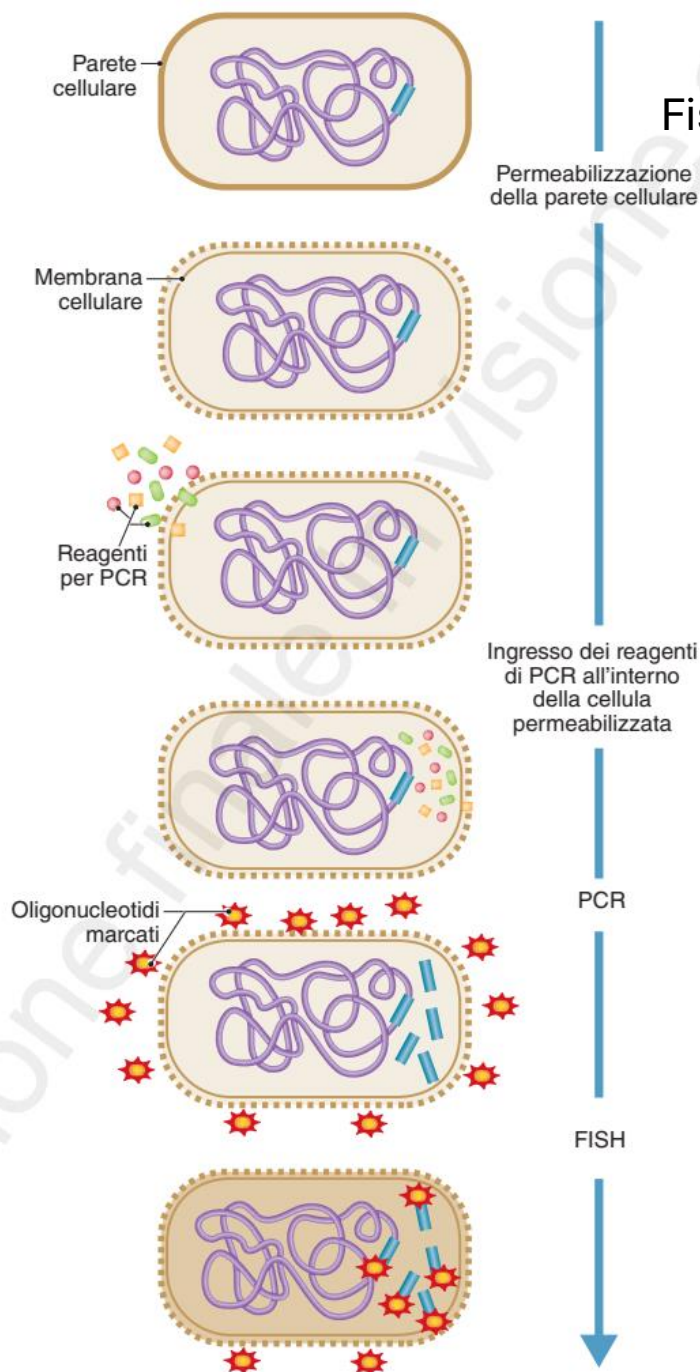
Degradazione del filamento di RNA e normale reazione di amplificazione

Amplificazione di tutti gli RNA



Degradazione del filamento di RNA e normale reazione di amplificazione

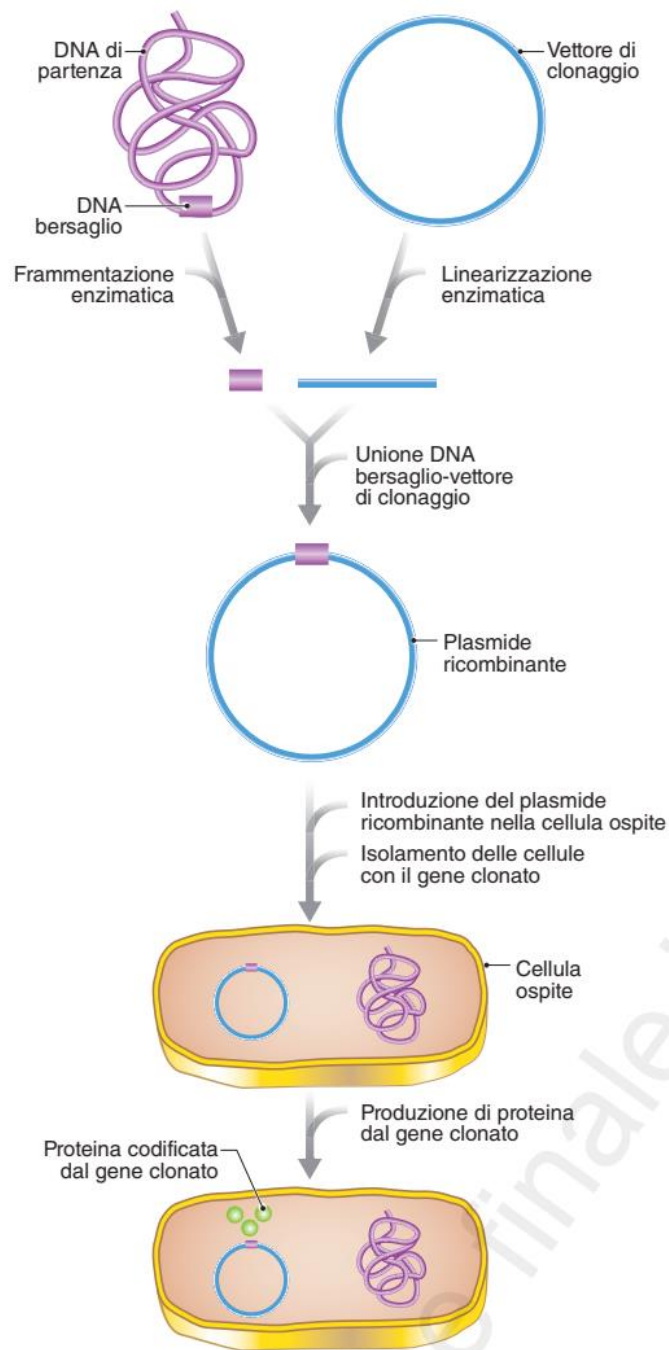
PCR *in situ* e FISH



Rappresentazione schematica della tecnica della PCR *in situ*.

Mediante la PCR *in situ* è possibile:

- ■ utilizzare una qualsiasi sequenza di DNA come bersaglio, il che ha come conseguenza immediata un'alta specificità;
- ■ valutare la presenza di un gene mutato all'interno
- di una cellula, grazie all'alta specificità;
- ■ identificare un gene estraneo all'interno della cellula ospite, ad esempio un DNA virale o un transgene;
- ■ monitorare la presenza di un microrganismo direttamente all'interno di un campione ambientale,
- come nel caso di comunità microbiche complesse;
- ■ tracciare elementi genetici mobili come i trasposoni;
- ■ monitorare e seguire il destino di plasmidi all'interno di una comunità microbica per verificare il livello di trasferimento genico orizzontale;
- ■ monitorare, mediante RT-PCR (vedi oltre), l'espressione di un determinato gene e, quindi, la sua funzione.



Il clonaggio

Step 1: taglio del plasmide e del DNA target via enzimi di restrizione

Step 2: Ligazione con ligasi per inserire il DNA target nel vettore

Step 3: Trasformazione del vettore

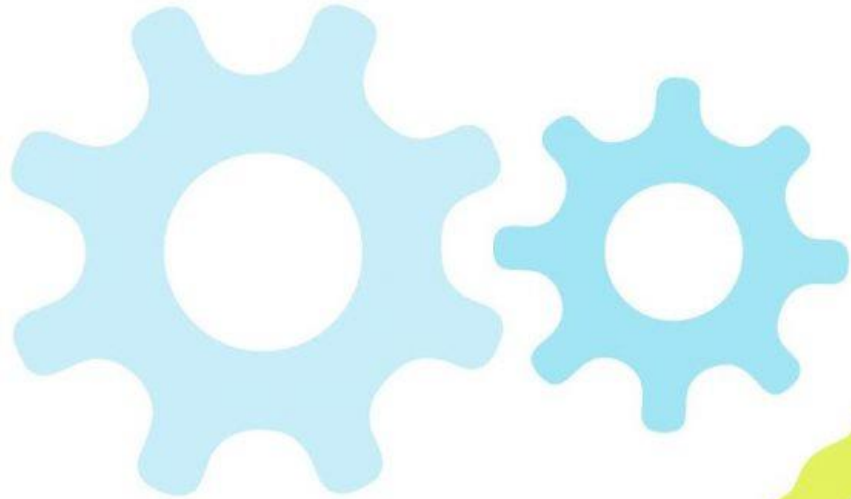
Step 4: Verifica e selezione del vettore

Step 5: Espressione del vettore

FIGURA 20.1 ► Rappresentazione schematica di un esperimento di clonaggio genico.

CRISPR

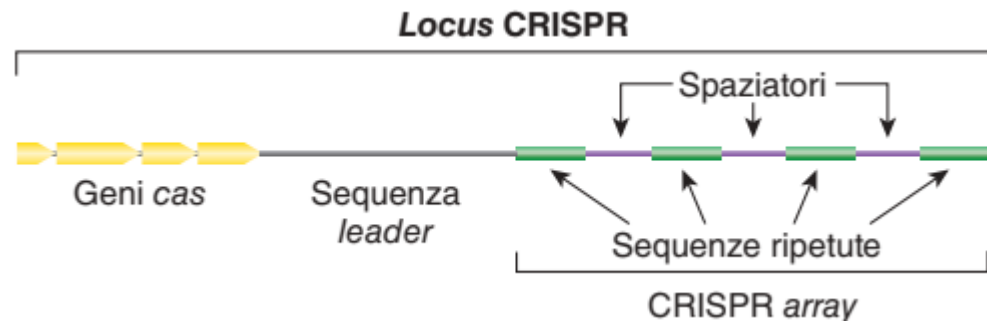
Clustered Regularly Interspaced
Short Palindromic Repeats



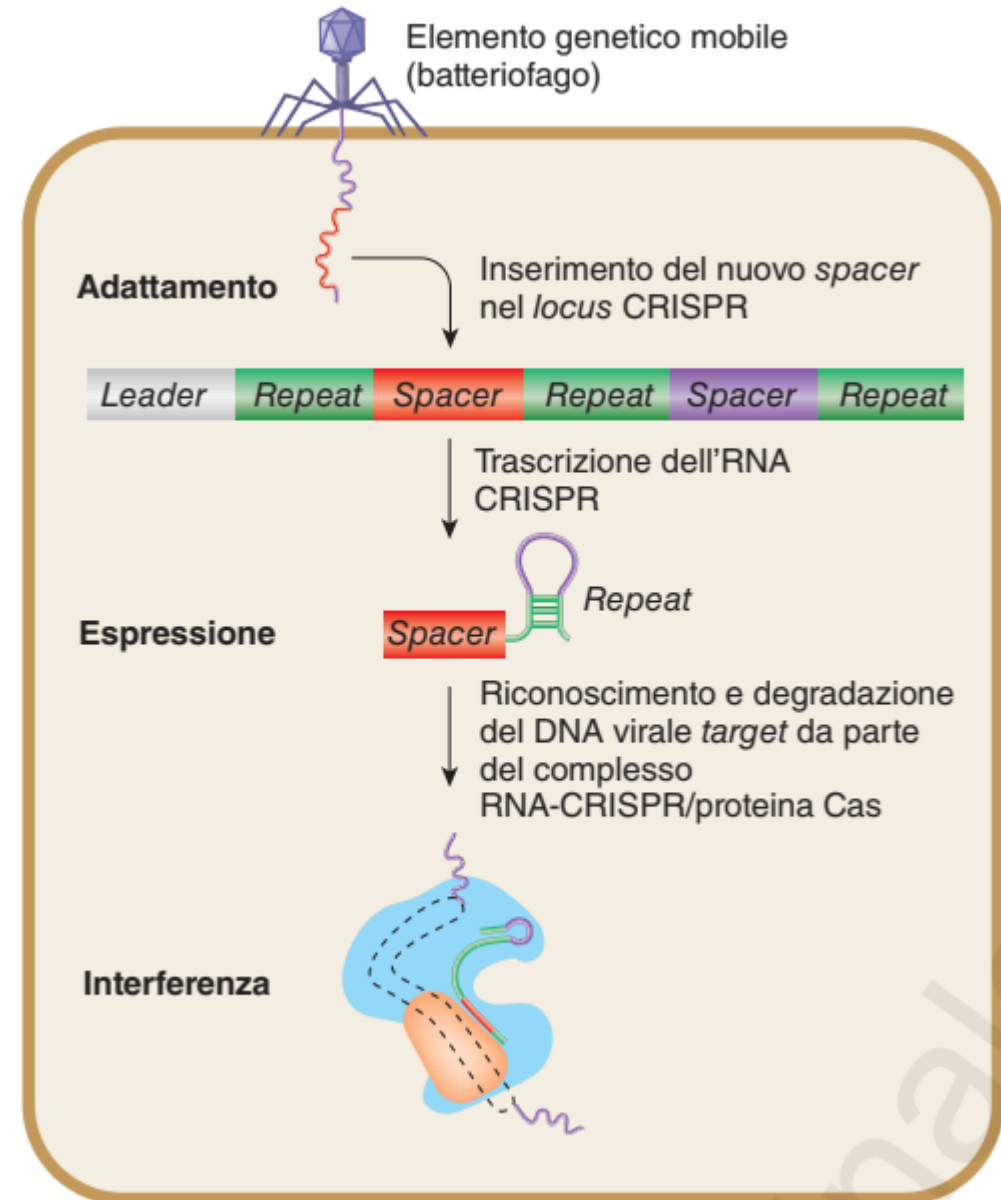


*“**Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna** are awarded the Nobel Prize in Chemistry 2020 for discovering one of gene technology’s sharpest tools: the CRISPR/Cas9 genetic scissors. Researchers can use these to change the DNA of animals, plants and microorganisms with extremely high precision. This technology has revolutionised the molecular life sciences, brought new opportunities for plant breeding, is contributing to innovative cancer therapies and may make the dream of curing inherited diseases come true.”*

CRISPR/Cas e l'immunità batterica

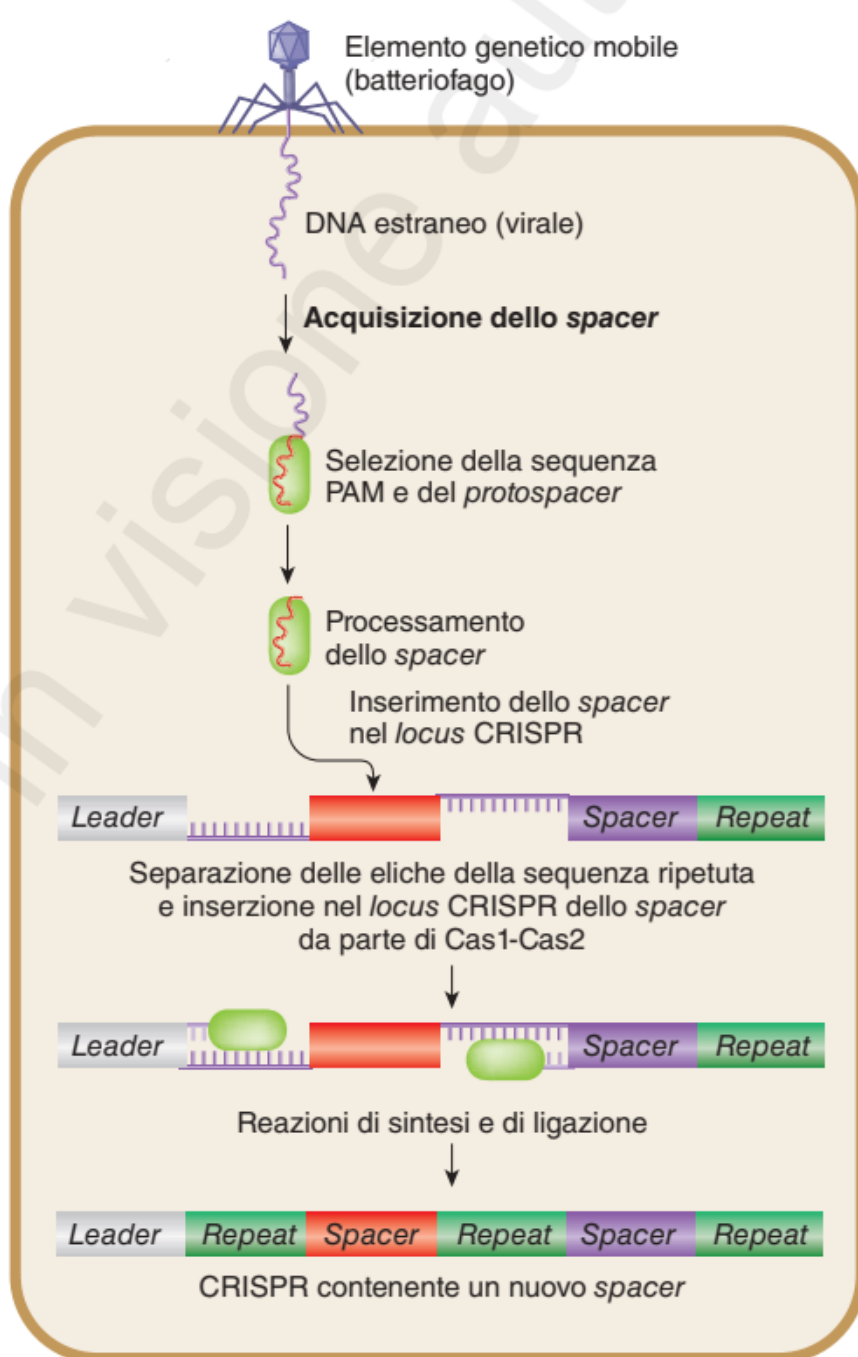



- CRISPR (pronuncia *crisper*) è l'acronimo di **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats** e identifica dei frammenti di DNA procariotico che contengono corte ripetizioni (*repeats*) di sequenze di basi (di 21-48 paia di basi) in cui ogni ripetizione è seguita da piccoli segmenti di DNA spaziatore (*spacer*) che deriva da esposizioni precedenti a DNA plasmidico o virale.
- Queste ripetizioni furono per la prima volta descritte in *E. coli* negli anni '80 del secolo scorso, ma la loro funzione non fu chiarita fino al 2007, quando Barrangou e i suoi collaboratori dimostrarono che il batterio *Streptococcus thermophilus* può diventare resistente a un batteriofago integrando un segmento del DNA virale all'interno di un locus CRISPR presente nel DNA batterico.
- CRISPR-Cas fornisce alle cellule procariotiche una forma di **immunità acquisita**, **eliminando il DNA estraneo** di batteriofagi e altri elementi genetici mobili. Infatti, le sequenze *spacer* dei CRISPR riconoscono e tagliano le sequenze di DNA esogene in modo simile al sistema di RNAi (*RNA interference*) negli organismi eucariotici.
- NOTA: una differenza sostanziale tra il sistema CRISPR-Cas e il sistema immunitario dell'uomo è che CRISPR-Cas modifica il genoma del microorganismo in risposta all'infezione e, quindi, favorisce una **immunità ereditabile**.



Fase di adattamento

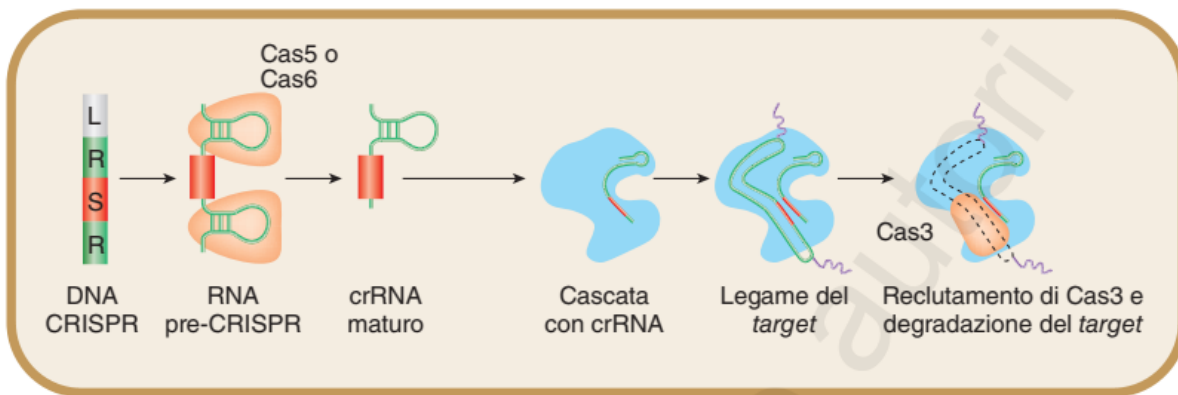
- Quando un elemento genetico mobile (come il DNA di un batteriofago) penetra nel citoplasma di una cellula batterica, una corta sequenza (Protospacer Adjacent Motif + protospacer), le due eliche della sequenza ripetuta si separano, permettendo l'entrata del *protospacer*, e successivamente, grazie all'azione di ricombinasi e delle DNA polimerasi, si ricostituisce la doppia elica della sequenza ripetuta (che viene così duplicata); la DNA ligasi salda covalentemente la sequenza in cui il *protospacer* è entrato, trasformandolo così in *spacer*.



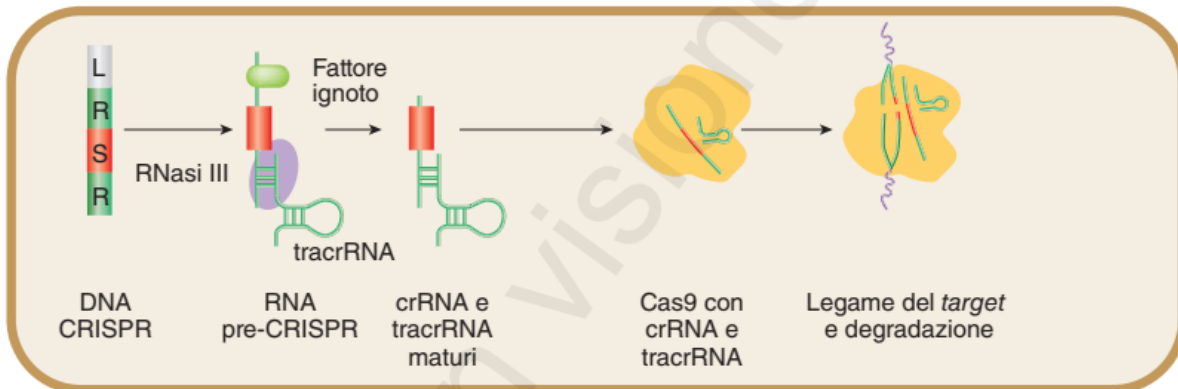
 Fattore non identificato

Espressione dell'RNA CRISPR

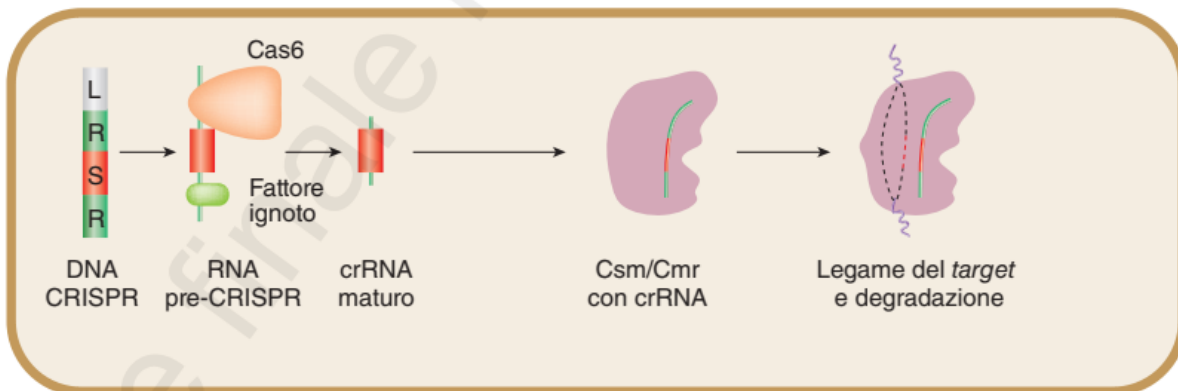
Interferenza del target



Tipo I



Tipo II



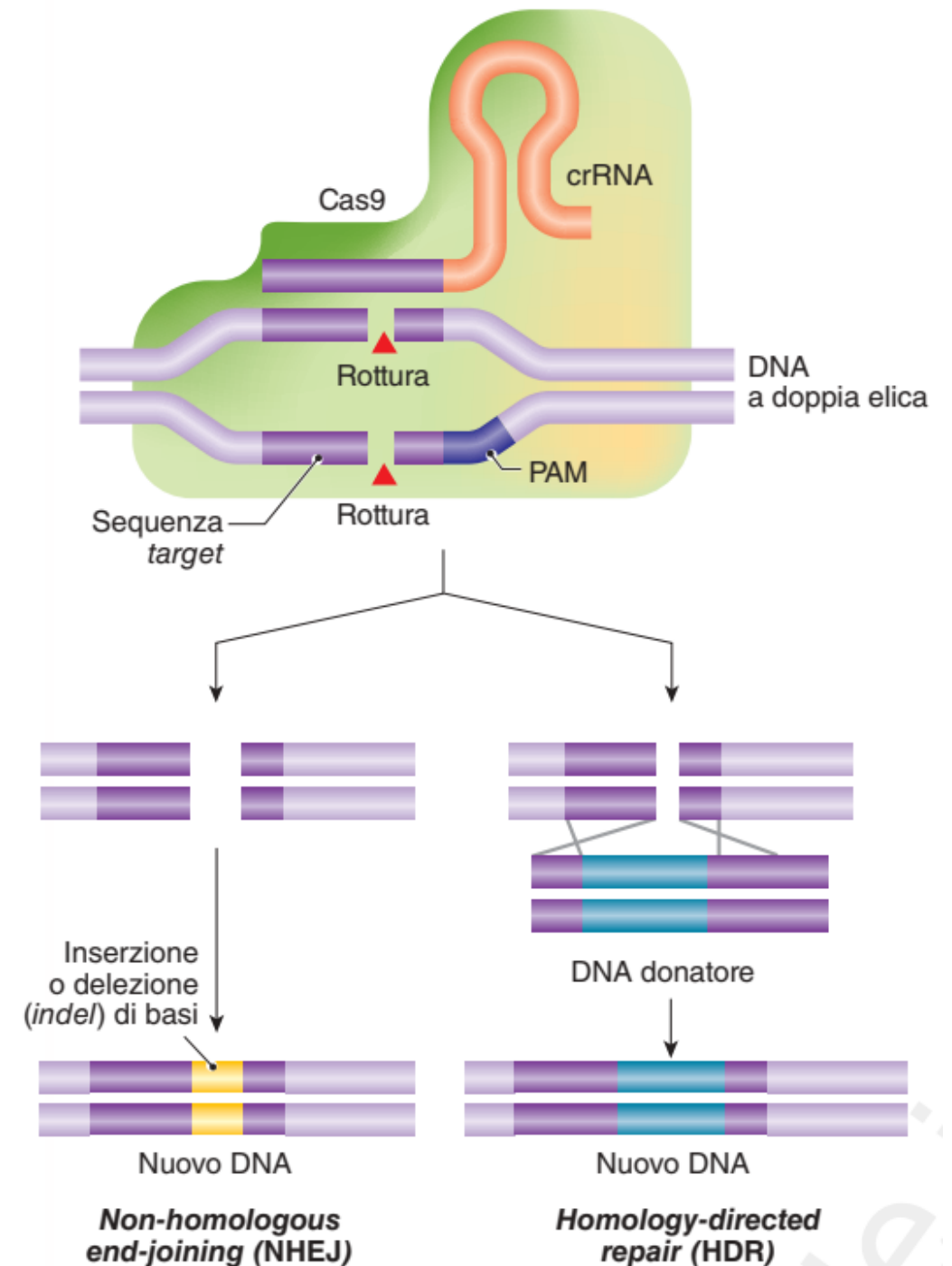
Tipo III

Varie tipologie di CRISPR/Cas

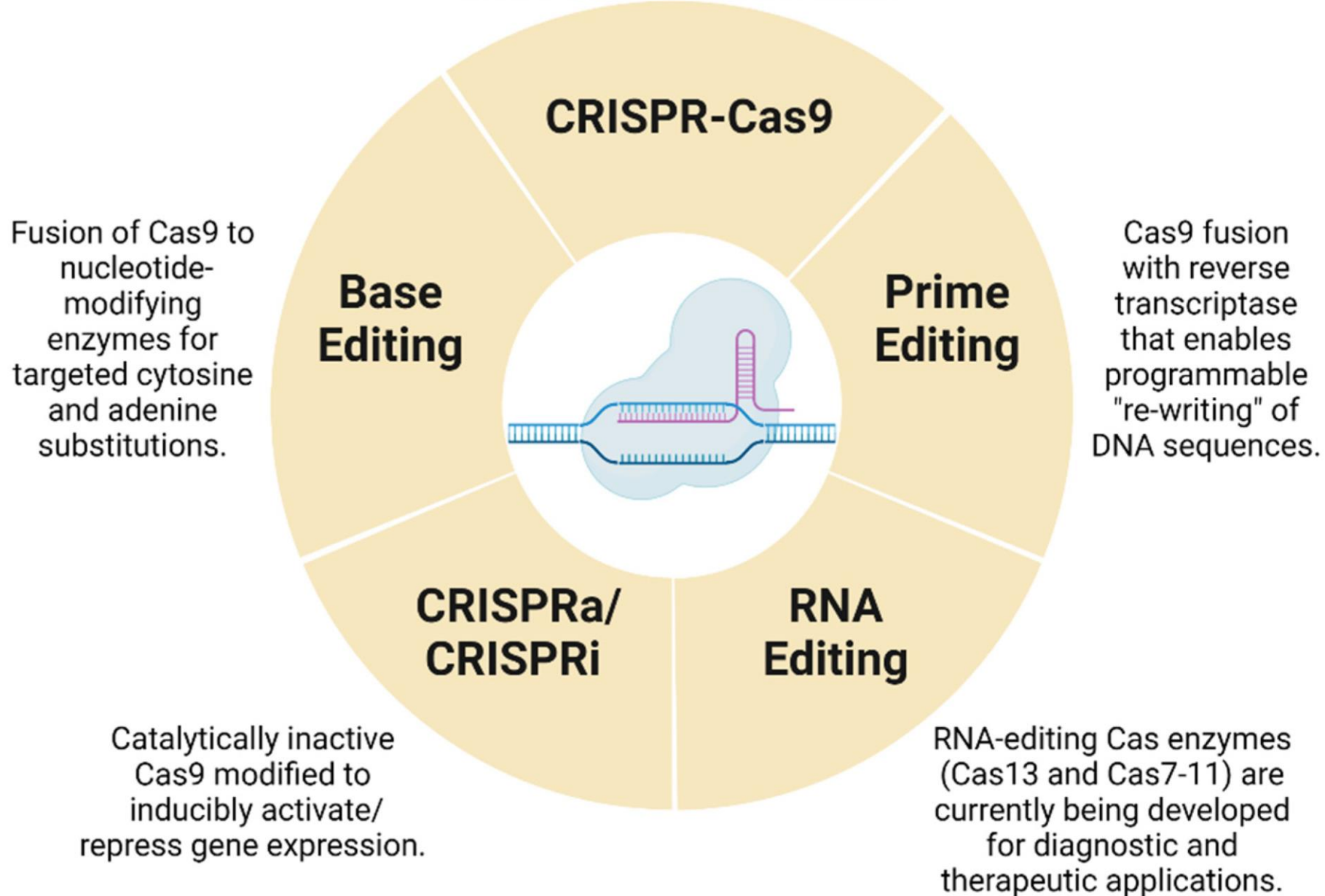
- Tutte le tipologie di Sistema CRISPR/Cas coinvolgono una fase di espressione degli RNA, che vengono usati per riconoscere i target e tagliarli tramite le proteine Cas

Utilizzo di CRISPR/Cas come forbici molecolari per il gene editing

- Tramite l'espressione di RNA guida si può dirigere il taglio verso regioni specifiche, poi riparate dai meccanismi endogeni di riparazione del DNA.



Canonical CRISPR-Cas system.
Induces site-specific DSBs in
genomic DNA. Primary system
used in current clinical studies.



Metodi di sequenziamento

- **Prima generazione:** Sanger
 - Bassa resa, precisa
- **Seconda generazione:** Pyrosequencing, Solid, Illumina
 - Altissima resa. Molecole corte (100-600bp)
- **Terza generazione:** Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT)
 - Alti tassi di errore (anche se metodi per migliorare) e molecole piu' lunghe (>1Mb).

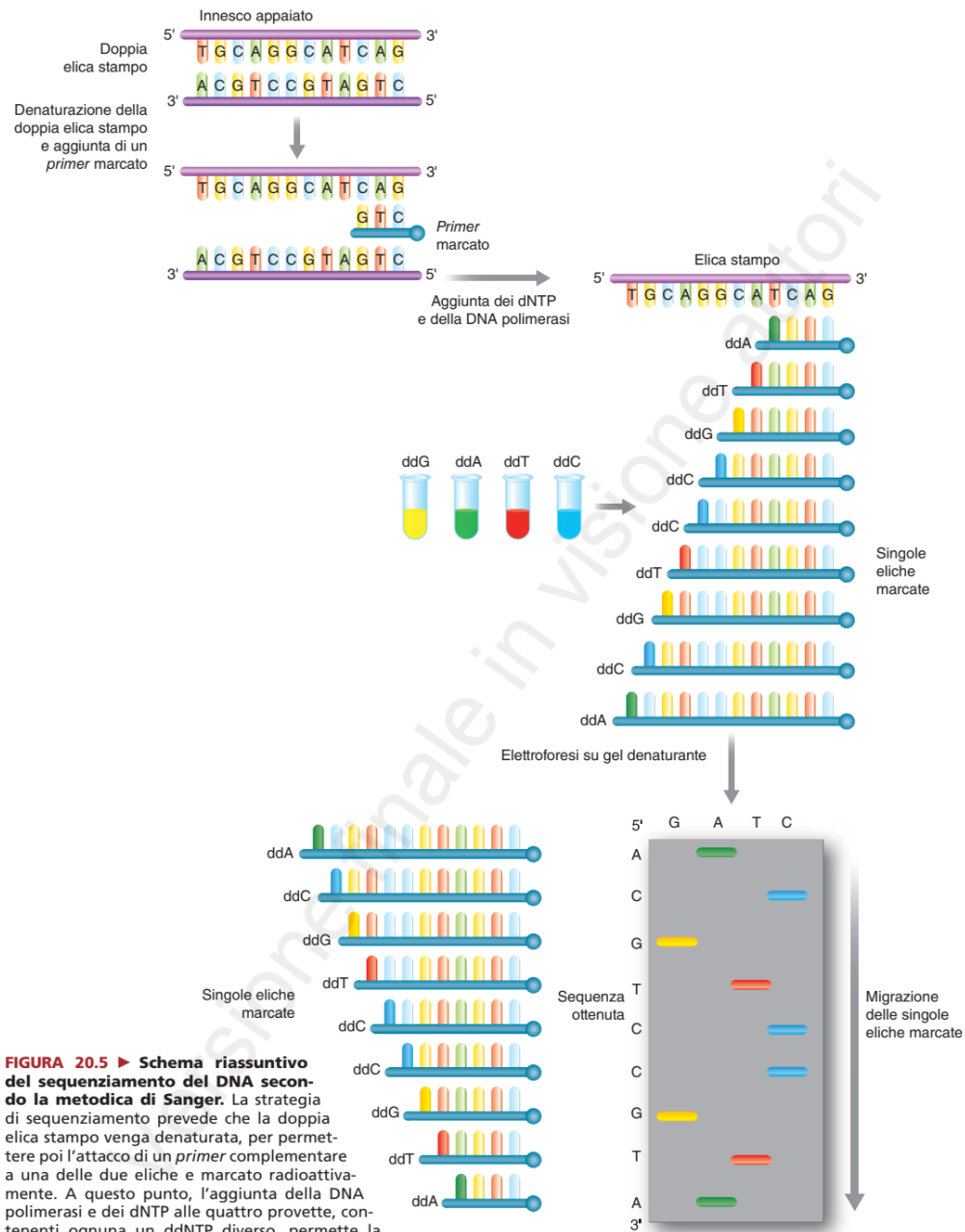


FIGURA 20.5 ▶ Schema riassuntivo del sequenziamento del DNA secondo la metodica di Sanger. La strategia di sequenziamento prevede che la doppia elica stampo venga denaturata, per permettere poi l'attacco di un *primer* complementare a una delle due eliche e marcato radioattivamente. A questo punto, l'aggiunta della DNA polimerasi e dei dNTP alle quattro provette, contenenti ognuna un ddNTP diverso, permette la sintesi dell'elica complementare. La sintesi si interrompe tutte le volte che la DNA polimerasi introduce un ddNTP. In questo modo si generano frammenti di lunghezza diversa, ognuno dei quali termina in corrispondenza di una specifica base. Una volta terminata la reazione di sintesi, i frammenti a singola elica neosintetizzati vengono separati in base alla lunghezza mediante elettroforesi su gel di poliaccrilamide (denaturante) e la sequenza viene letta a partire dal frammento che ha migrato più velocemente (cioè quello in cui si è avuta l'inserzione del ddNTP localizzato alla prima base dopo la fine del *primer*, nel caso dello schema ddATP).

Metodo di sequenziamento di Sanger

- Comporta la sintesi dell'elica complementare, ma provocando artificialmente in alcune molecole neosintetizzate un'interruzione prematura della sintesi in corrispondenza di alcune basi nucleotidiche, tramite **dideoxiribonucleotidi (ddNTP)**, i quali, essendo privi del gruppo ossidrilico in posizione 3', impediscono l'aggiunta di altri nucleotidi.

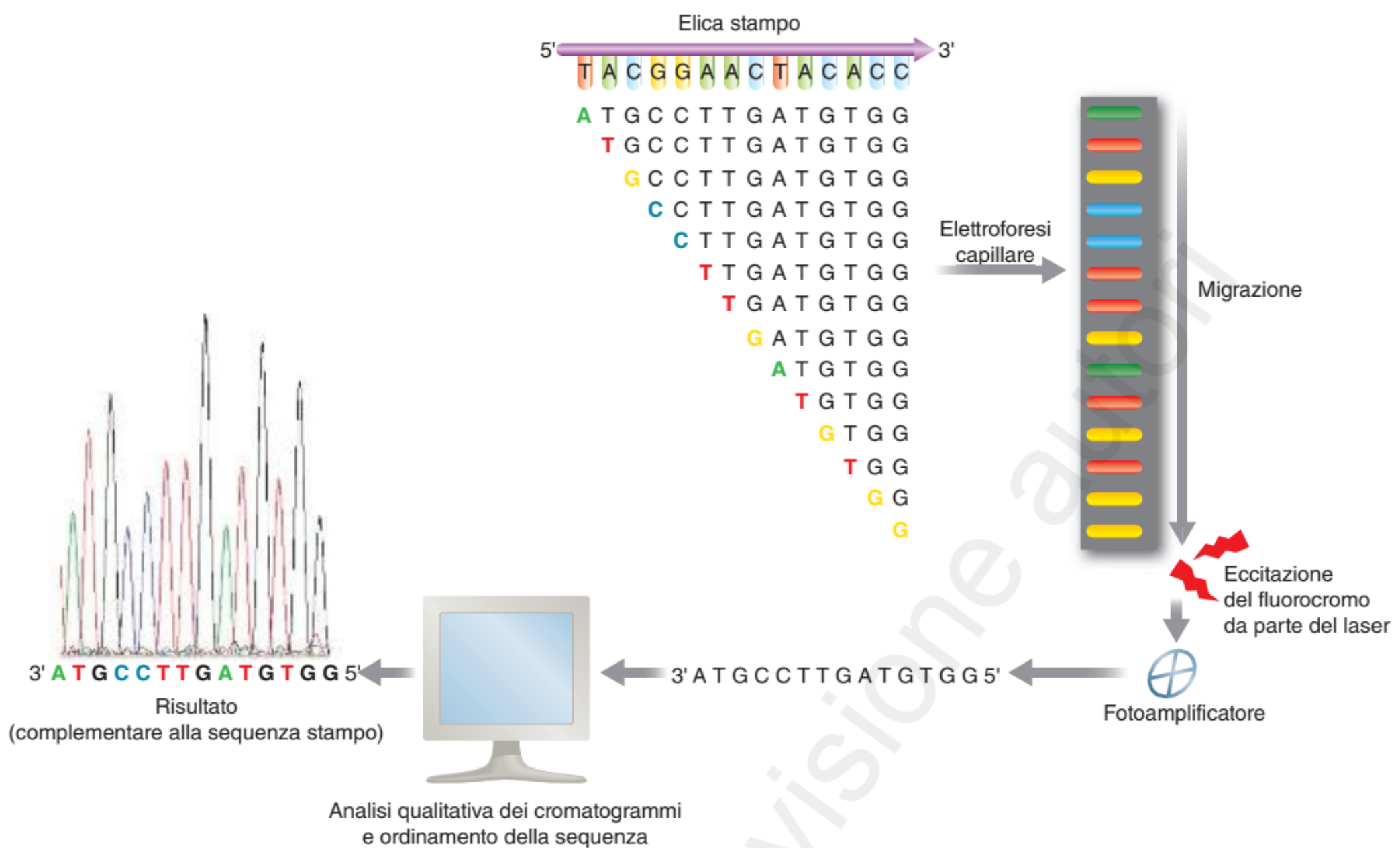


FIGURA 20.6 ► Rappresentazione schematica di una reazione di sequenziamento del DNA secondo la metodica di Sanger utilizzando nucleotidi marcati con fluorocromi. La base marcata con fluorescenza gialla (G) viene poi trasformata in nero per una più facile visualizzazione.

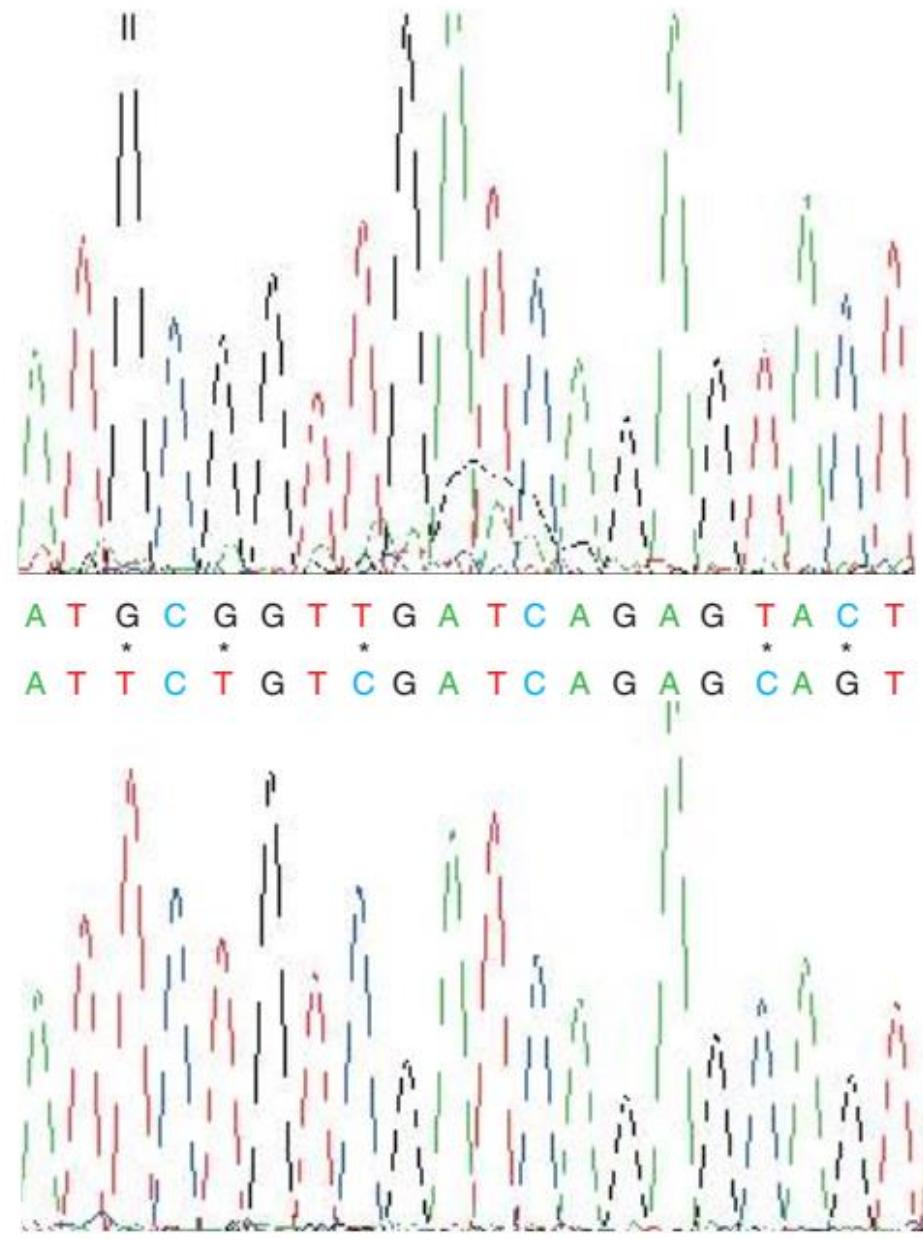
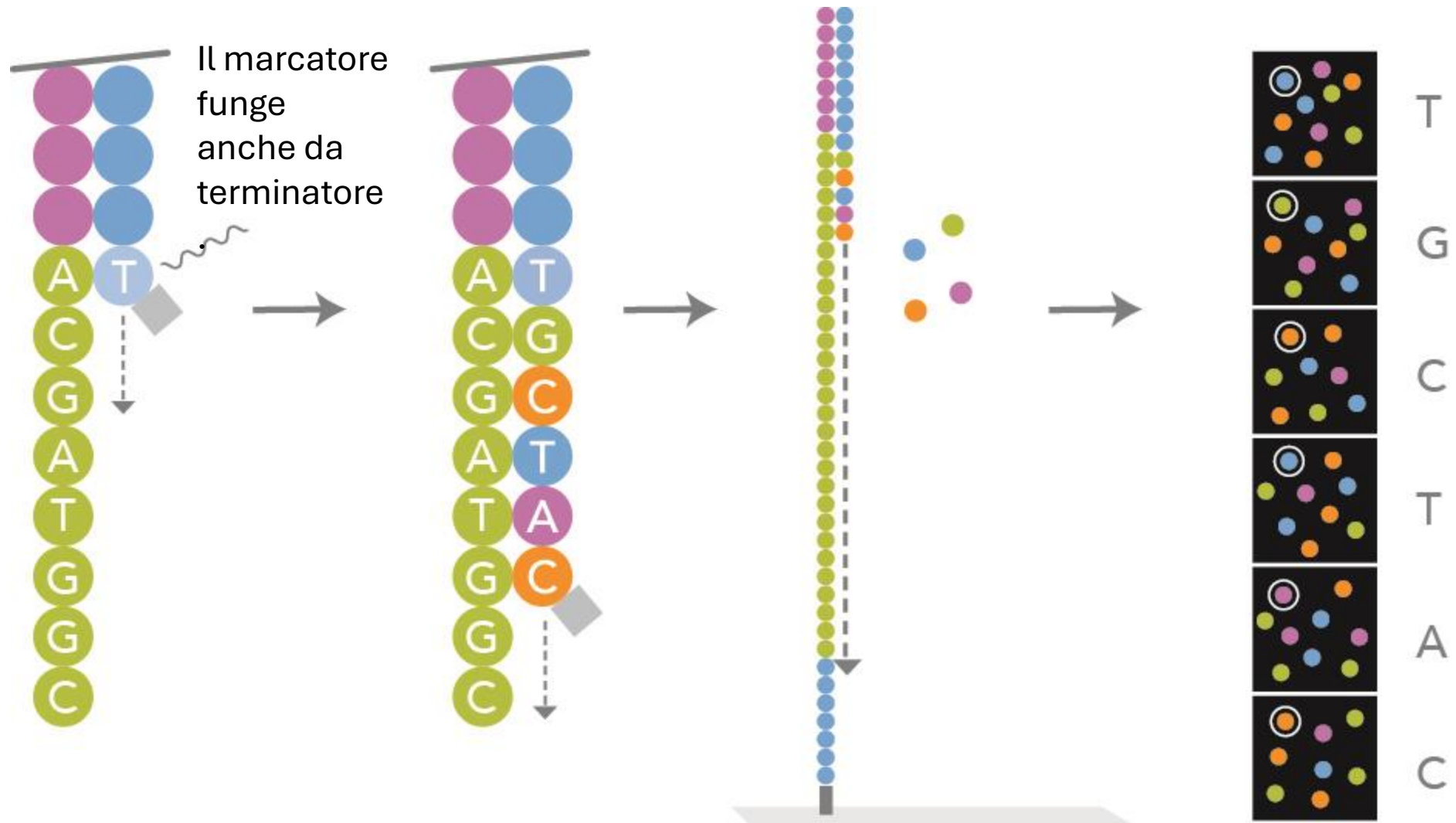
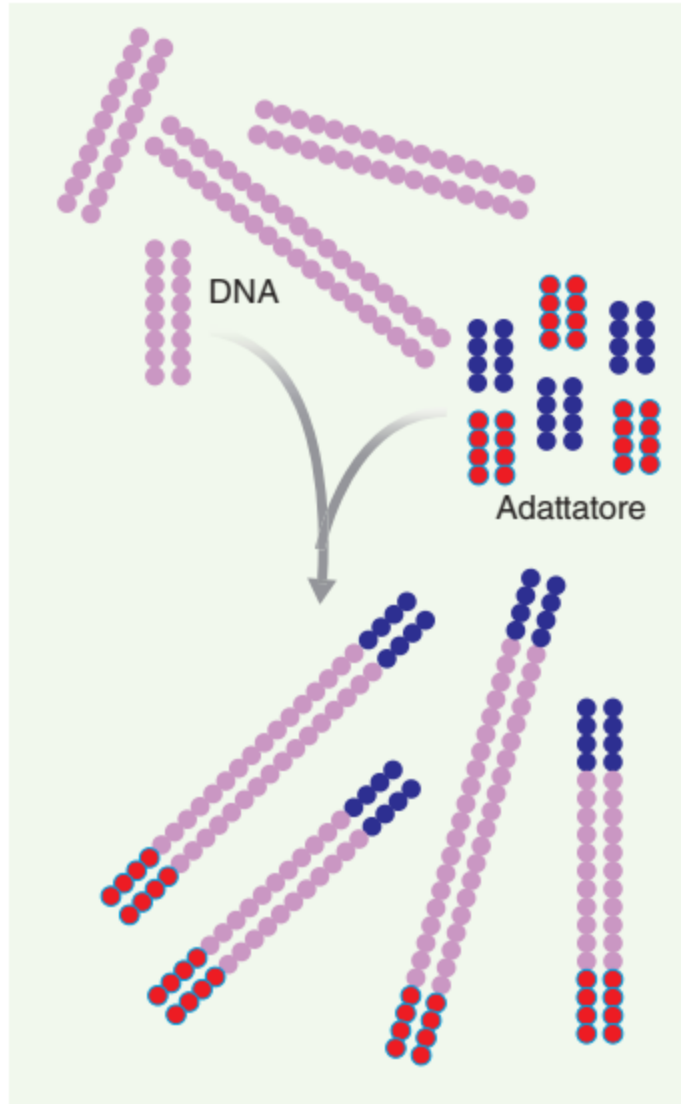


FIGURA 20.20 ► Individuazione di SNP mediante analisi della sequenza nucleotidica. Gli asterischi indicano le posizioni degli SNP.

Sequenziamento illumina (sequencing by synthesis)

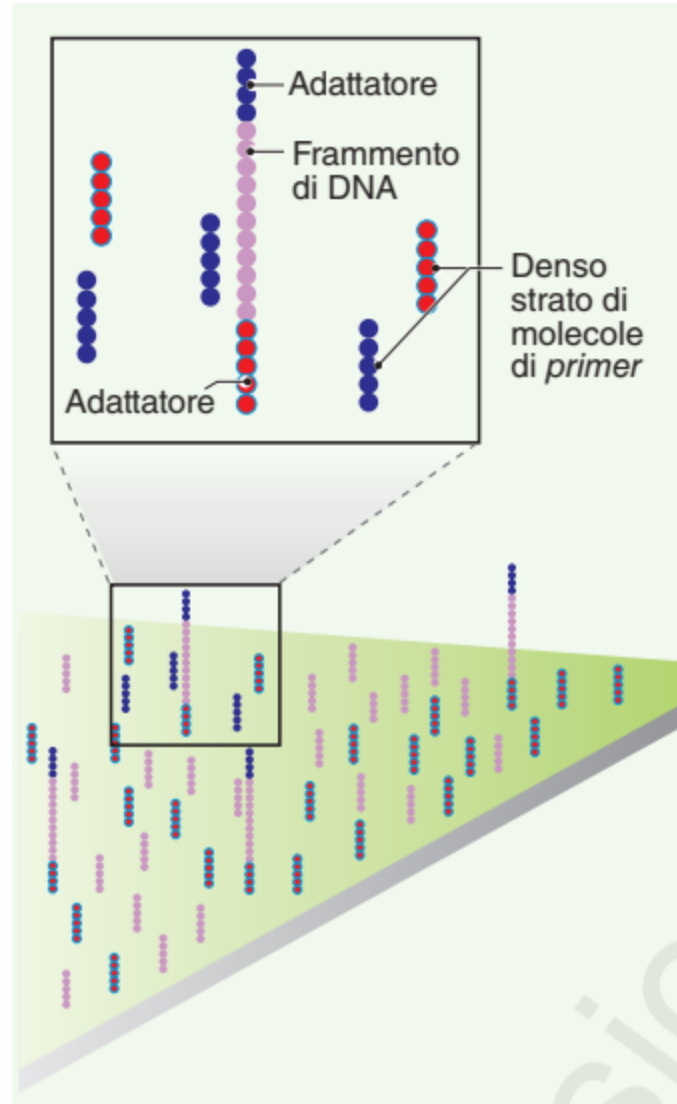


1 Preparazione del campione di DNA genomico



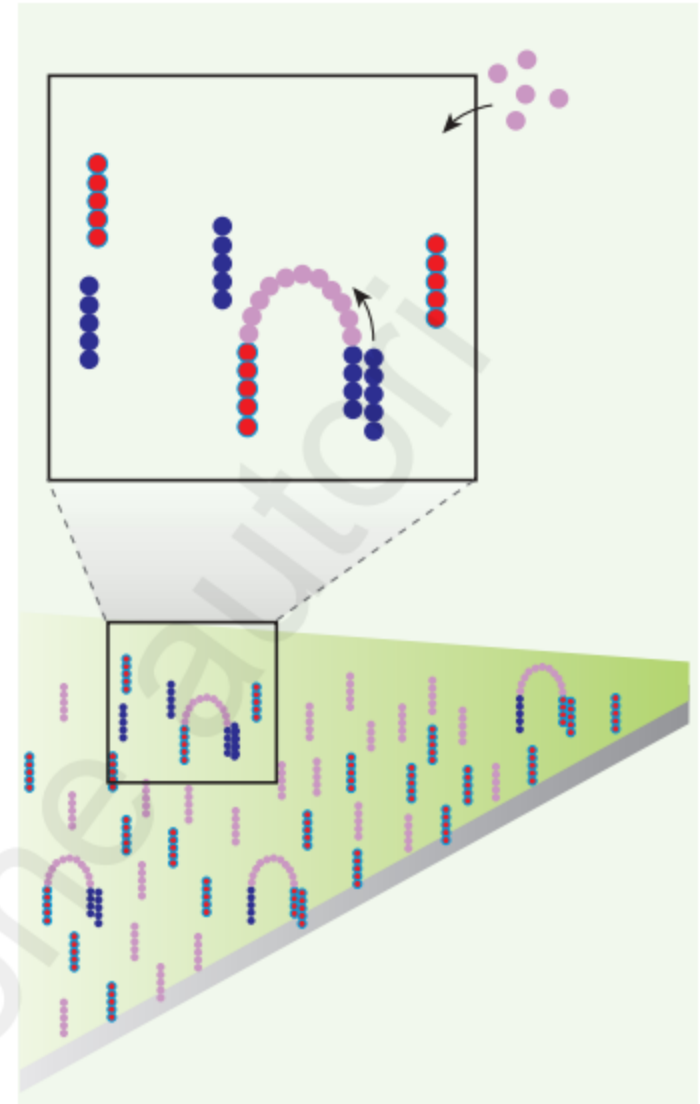
Frammentare in modo casuale il DNA genomico e ligare gli adattatori a entrambe le estremità dei frammenti

2 Adesione del DNA alla superficie



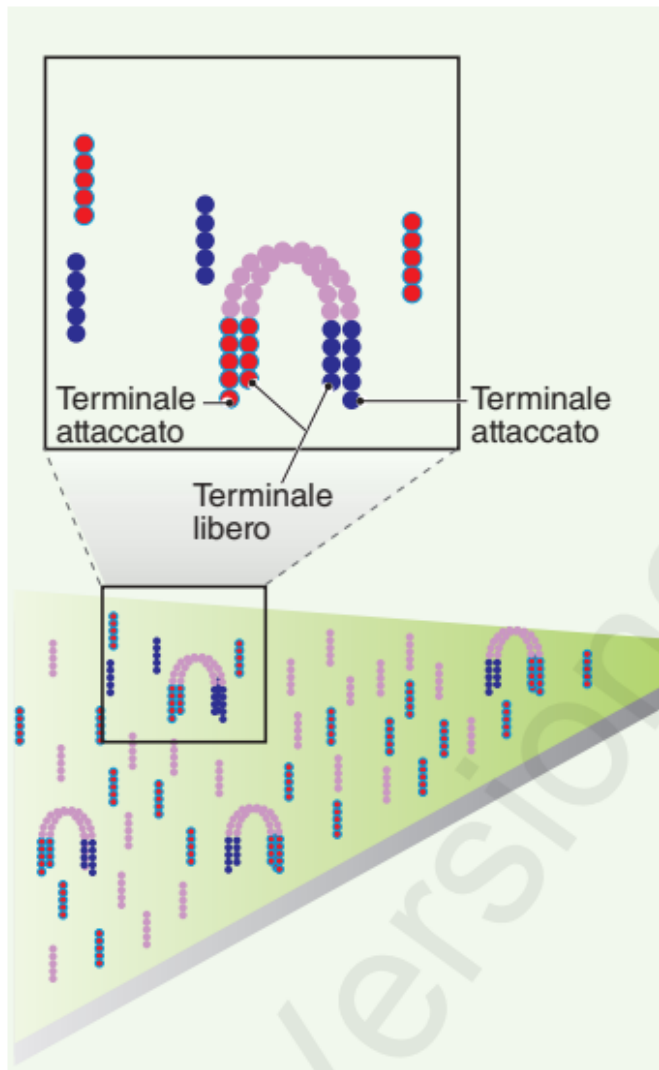
Legare casualmente i frammenti a singola elica alla superficie interna dei canali della piastra di sequenziamento o *flow cell*

3 Amplificazione del "ponte"



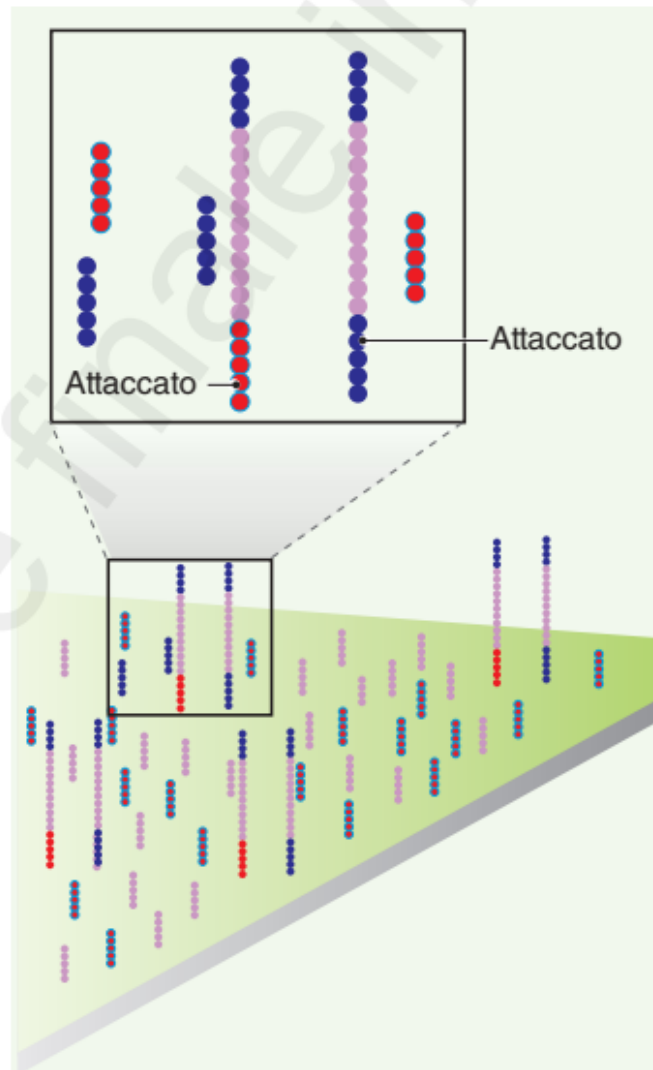
I frammenti immobilizzati, dalla caratteristica forma a "ponte", diventano il substrato per l'amplificazione, aggiungendo dNTP non marcati e DNA polimerasi

4 I frammenti diventano a doppia elica



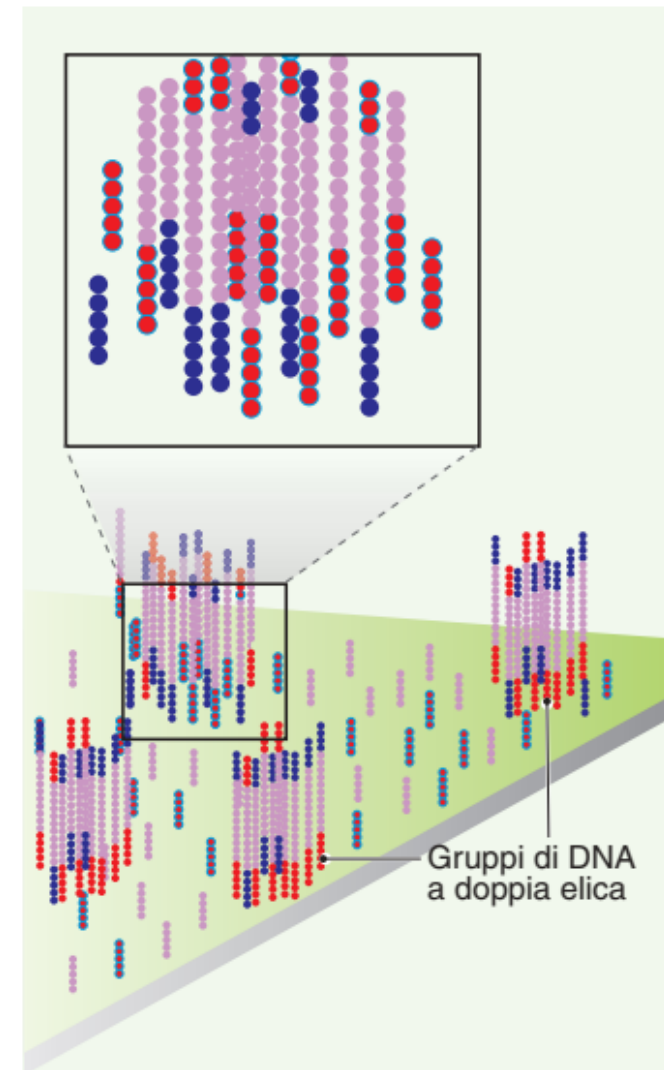
L'enzima incorpora i nucleotidi per sintetizzare "ponti" a doppia elica sul substrato in fase solida

5 Denaturazione delle molecole a doppia elica



La denaturazione genera molecole stampo a singola elica ancorate al substrato, che formeranno il ponte

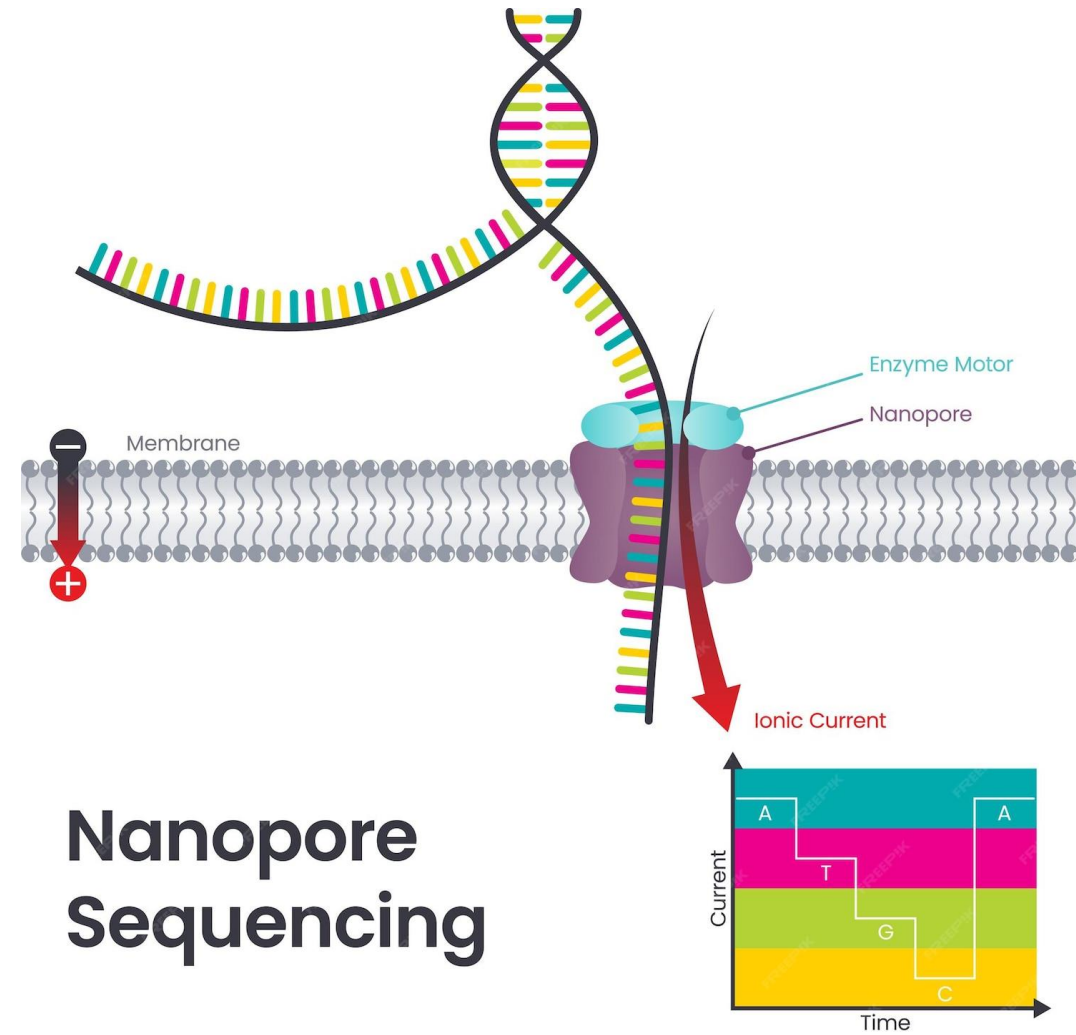
6 Completamento dell'amplificazione



Ripetendo ciclicamente i passaggi amplificazione-denaturazione-ponte, molti milioni di densi gruppi di DNA a doppia elica sono generati in ogni canale della *flow cell*. Sono questi densi gruppi di molecole identiche che fungeranno da substrato per il sequenziamento vero e proprio

SMRT: Nanopore sequencing

- Alti errori
- Capace di leggere DNA, modifiche del DNA e protein
- Portabile



Nanopore Sequencing

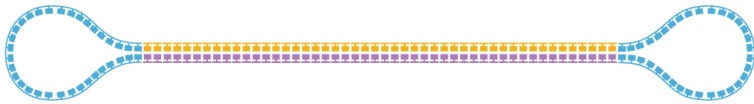


SMRT sequencing: PacBio

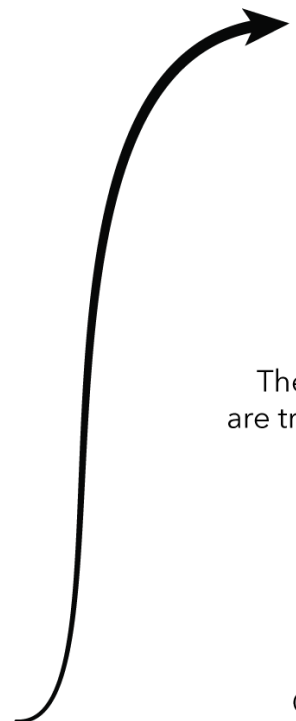
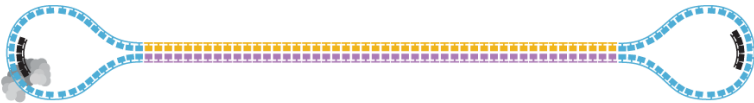
Start with high-quality double stranded DNA



Ligate SMRTbell adapters and size select



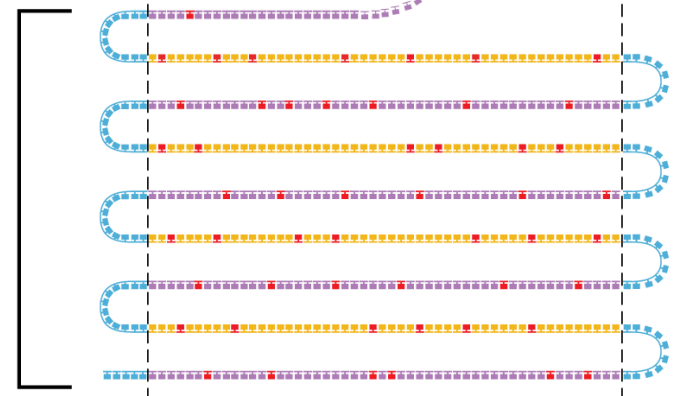
Anneal primers and bind DNA polymerase



Circularized DNA is sequenced in repeated passes



The polymerase reads are trimmed of adapters to yield subreads



Consensus is called from subreads



HiFi READ
(>99% accuracy)

Storia del DNA ricombinante



Struttura del DNA da Francis e Crick

1953



Sequenziamento Sanger e di Maxam e Gilbert

1977



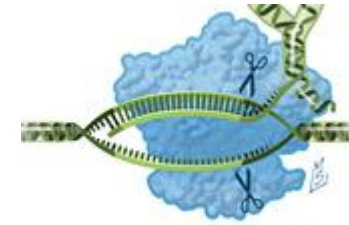
Scoperta degli enzimi di restrizione

1978



PCR di Kary Mullis

1983



CRISPR/Cas

2005



Illumina next generation sequencing

2007



Microsatelliti e polimorfismi di lunghezza

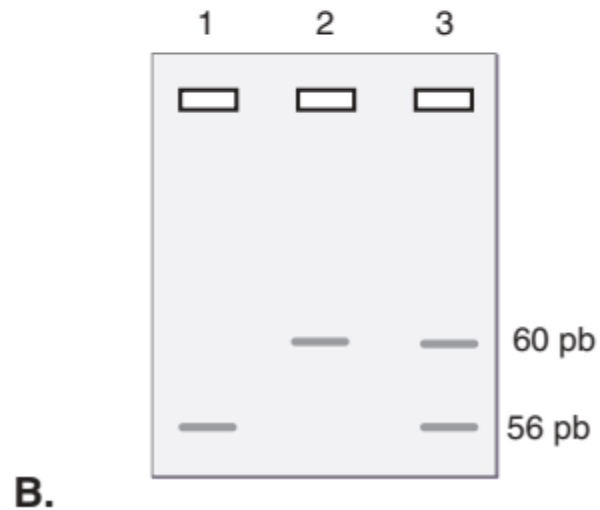
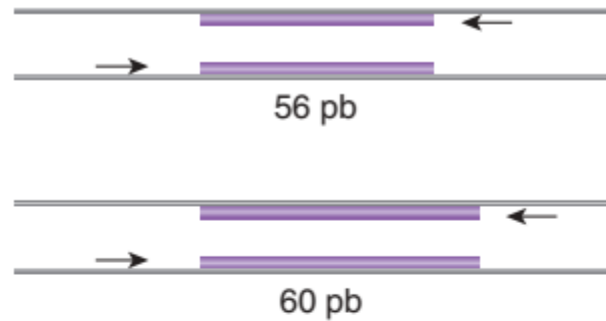
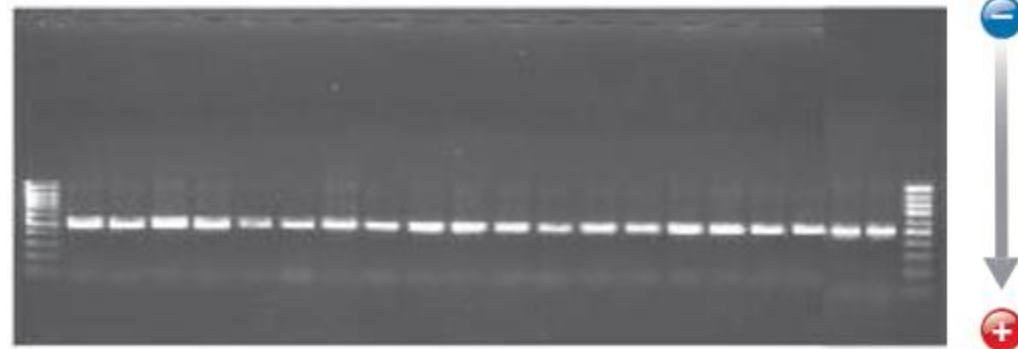
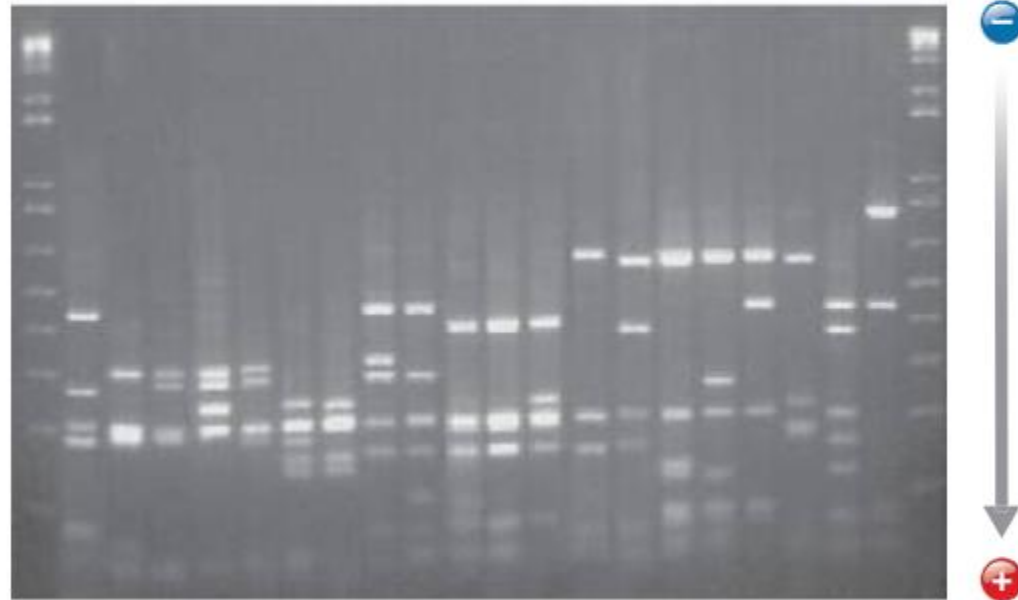


FIGURA 20.19 ► Polimorfismi di lunghezza di microsatelliti. (A) Esempio di polimorfismo in individui omozigoti ed eterozigoti $(CA)_n$. **(B)** Tecnica usata per l'individuazione del polimorfismo. La regione di DNA contenente la regione polimorfica viene amplificata per PCR con *primer* esterni e i frammenti ottenuti sono separati per elettroforesi.



A.



B.

FIGURA 20.18 ▶ Schema della tecnica PCR-RFLP. (A) Elettroforesi su gel di agarosio di ampliconi ottenuti per PCR da campioni di DNA diversi. **(B)** Elettroforesi su gel di agarosio degli stessi ampliconi trattati con un enzima di restrizione.

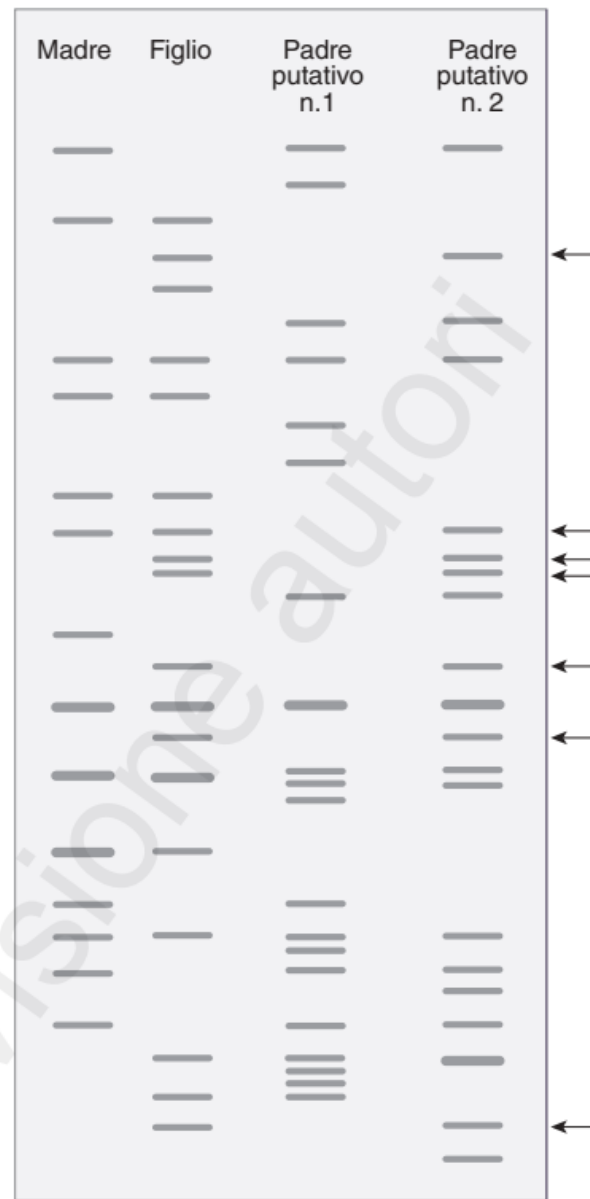


FIGURA 20.21 ► Esempio di *fingerprinting* molecolare. Le quattro colonne indicano l'impronta digitale molecolare di una madre, un figlio e due padri putativi. Il confronto dei profili indica chiaramente che il padre vero è il numero 2, poiché il suo profilo condivide con il figlio più bande (indicate con le frecce) di quante ne condivida quello del padre putativo n. 1.