

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

CORSO INTEGRATO: FISICA, CHIMICA
E PROPEDEUTICA BIOCHIMICA (10 CFU)

MODULO:
PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE (4 CFU)

Roberto Giacomini Stuffer

IL MODULO

"PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE" (4 CFU)

È SUDDIVISO IN DUE UNITÀ DIDATTICHE:

A) UNITÀ DIDATTICA

"PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" (2 CFU)

B) UNITÀ DIDATTICA

"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

L'UNITÀ DIDATTICA "PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" COMPRENDE:

- 1) I LIPIDI
- 2) I CARBOIDRATI
- 3) GLI AMMINOACIDI E LE PROTEINE
- 4) LE PROTEINE DEL CONNETTIVO
- 5) LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

L'UNITÀ DIDATTICA "BIOLOGIA MOLECOLARE" COMPRENDE:

- 6) LE MEMBRANE BIOLOGICHE
- 7) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (A)
- 8) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (B)
- 9) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI
- 10) LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

UNITÀ DIDATTICA
"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

VET.
UNTÀ DIDATTICA "BIOLOGIA MOLECOLARE"

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

Roberto Giacomini Stuffer

1. Gli enzimi di restrizione
2. La trascrittasi inversa
3. Il DNA ricombinante
4. La PCR

GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE
o
ENDONUCLEASI DI
RESTRIZIONE

LE ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Essi riconoscono sequenze di basi azotate specifiche nel DNA a doppia elica e tagliano **entrambi** i filamenti in punti specifici,

questi **bisturi naturali** sono indispensabili per:

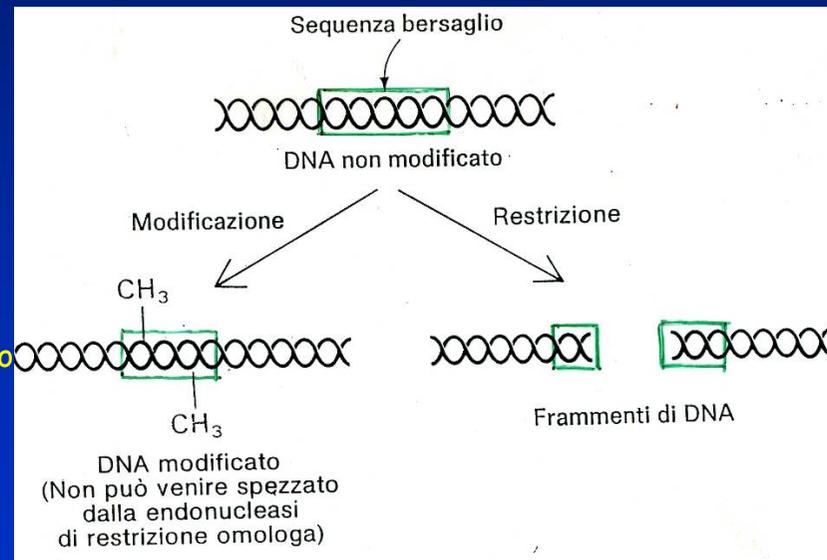
- analizzare la struttura dei cromosomi,
- sequenziare le molecole molto lunghe di DNA,
- isolare i geni,
- creare nuove molecole di DNA, che si possono poi clonare.

LA FUNZIONE DELLE ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Esse si trovano in numerose specie batteriche, riconoscono e digeriscono il DNA eterologo che viene "ristretto" (tagliato),

quello della cellula non viene digerito, perché la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione è metilata (e pertanto protetta) da una specifica DNA metilasi.

LE ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE



DNA appartenente al batterio

DNA appartenente a un intruso

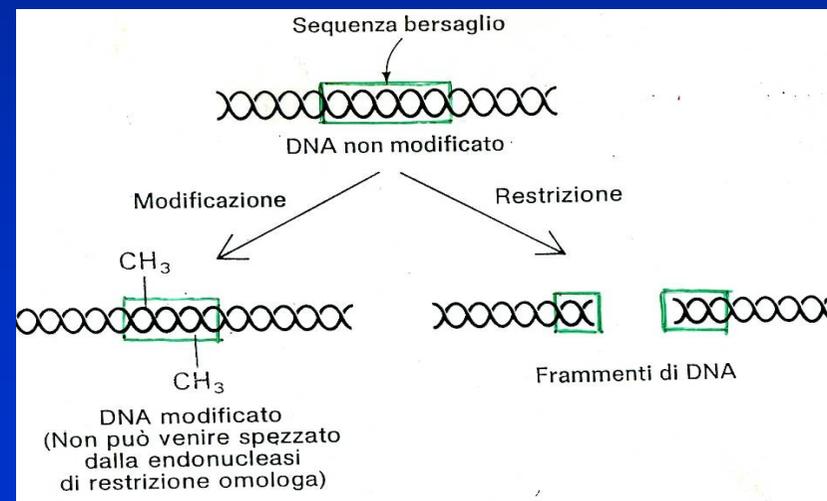
IL SISTEMA DI RESTRIZIONE- MODIFICAZIONE

L'endonucleasi di restrizione e la corrispondente metilasi
vengono denominate
SISTEMA DI RESTRIZIONE-MODIFICAZIONE.

IL SISTEMA DI RESTRIZIONE-MODIFICAZIONE

Le endonucleasi di restrizione batteriche riconoscono i siti bersaglio **non metilati** nelle molecole di DNA estraneo (es. DNA virale);

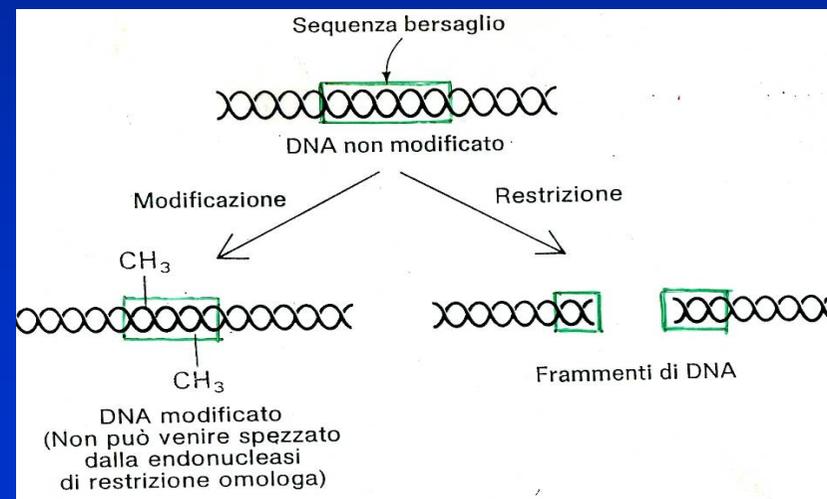
la metilasi e la endonucleasi di restrizione riconoscono la stessa sequenza di basi azotate.



IL SISTEMA DI RESTRIZIONE-MODIFICAZIONE

La **metilazione** di questi siti specifici è la **parola d'ordine** che indica che il DNA appartiene al batterio e non ad un intruso (es. virus),

essa avviene **subito dopo** la sintesi del DNA batterico ad opera di DNA metilasi appartenenti al batterio.

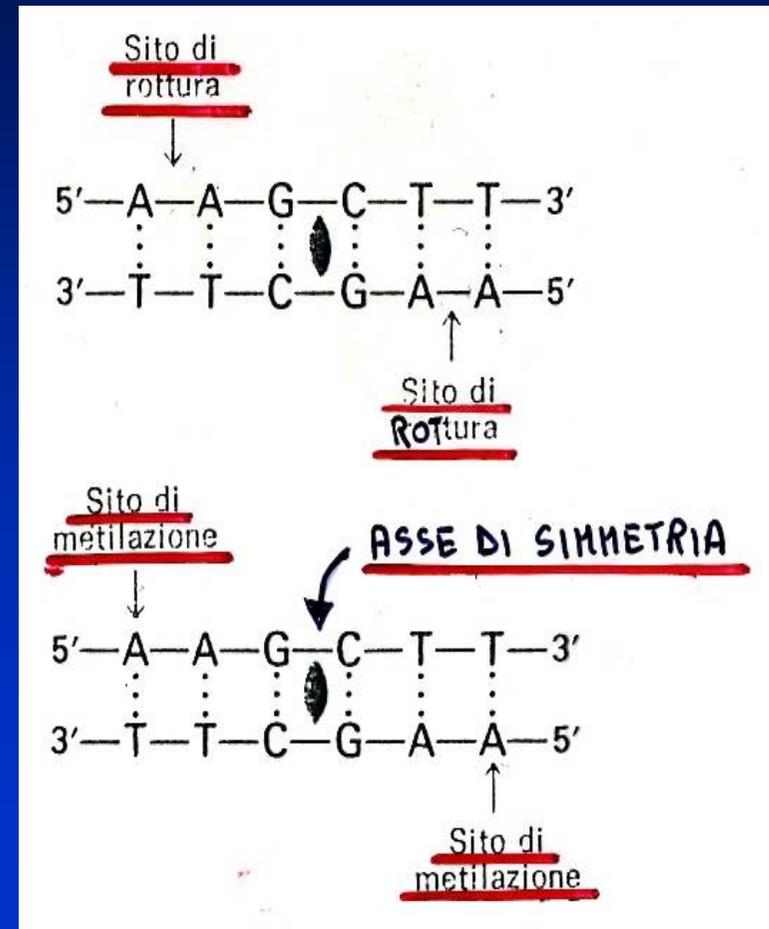


UN ESEMPIO DI SEQUENZA RICONOSCIUTA DA UN ENZIMA DI RESTRIZIONE

La maggior parte di questi enzimi riconosce sequenze specifiche di lunghezza compresa tra 4 e 8 basi azotate,

essi idrolizzano un legame fosfodiesterico su ciascun filamento;

la sequenza riconosciuta è palindromica.





PALINDROMO

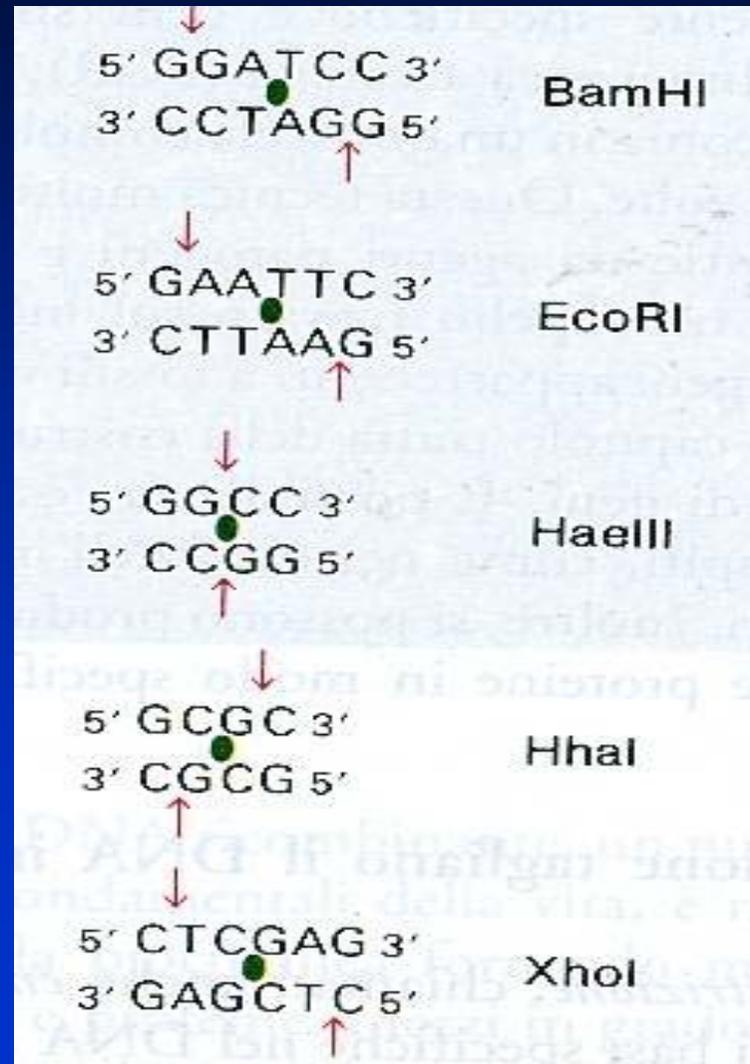
Deriva dal greco *palindromos*: tornare indietro di nuovo.

È una parola, frase o verso che risulta uguale quando viene letto da sinistra verso destra o da destra verso sinistra

es. radar, ossesso..

Nel DNA, il termine viene applicato quando vi sono delle ripetizioni invertite di una sequenza di basi azotate, con una doppia simmetria presente nelle due catene.

LE SEQUENZE DI RICONOSCIMENTO DI ALCUNE ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE



LE ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE SONO INDICATE DA:

un'abbreviazione a tre lettere che indica l'organismo di appartenenza,
l'indicazione del ceppo (se necessaria),
un numero romano (se l'organismo produce più enzimi di restrizione).

Enzyme	Source Microorganism	Recognition Site
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	↓ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- ↑
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	↓ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- ↑
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	↓ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- ↑
KpnI	<i>Klebsiella pneumonia</i>	↓ -G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G- ↑

GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE DI USO PREVALENTE DA PARTE DEI BIOLOGI SCINDONO ENTRAMBI I FILAMENTI DEL DNA IN MODO SITO-SPECIFICO E SI DIVIDONO IN TRE TIPI PRINCIPALI.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Esempio	<i>EcoB</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoPI</i>
Sito di riconoscimento	TGAN ₈ TGCT	GAATTC	AGACC
Sito di taglio	Fino a 10 kbp dal sito di riconoscimento	Tra G e A (entrambi i filamenti)	24–26 paia di basi in direzione 3' dal sito di riconoscimento
Sito di metilazione	^m TGAN ₈ TGCT ACTN ₈ ACGA ^m	^m GAATTC CTTAAG ^m	^m AGACC (solo un filamento metilato)
Nucleasi e metilasi nello stesso enzima?	Sì	No	Sì
Requisiti per la scissione	ATP, Mg ²⁺ , AdoMet	Mg ²⁺ o Mn ²⁺	Mg ²⁺ , AdoMet
Requisiti per la metilazione	ATP, Mg ²⁺ , AdoMet	AdoMet	Mg ²⁺ , AdoMet

AdoMet (S-adenosilmetionina) è un donatore di gruppi metilici

Tipo I

Esso presenta tre subunità:

la catena α ha l'attività nucleasica,

la catena β ha l'attività metilasica,

la catena γ riconosce la sequenza palindromica;

la scissione avviene **fino a 10 kbasi (kbp)** dal sito di riconoscimento e la metilazione avviene al suo interno;

l'enzima si sposta lungo il DNA, idrolizzando ATP (richiesto per la traslocazione dell'enzima e per il superavvolgimento del DNA).

Tipo II

Molti enzimi sono omodimeri, con subunità di P.M. tra 30 e 40 kDa,

ciascuno ha una corrispondente metilasi (che **non** fa parte dell'omodimero);

il tipo II non richiede ATP e taglia il DNA **all'interno** della stessa sequenza di riconoscimento,

si utilizzano diffusamente nella **tecnologia del DNA ricombinante**.

LE SEQUENZE DI RICONOSCIMENTO DI ALCUNE ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE DI TIPO II, CON INDICATE LE BASI AZOTATE CHE VENGONO METILATE (*)

table 29-2

Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases

<i>Bam</i> HI	<pre> ↓ * (5') G G A T C C (3') C C T A G G * ↑ </pre>	<i>Hind</i> III	<pre> (5') A A G C T T (3') T T C G A A ↑ </pre>
<i>Cl</i> al	<pre> ↓ * (5') A T C G A T (3') T A G C T A * ↑ </pre>	<i>Not</i> I	<pre> ↓ (5') G C G G C C G C (3') C G C C G G C G ↑ </pre>
<i>Eco</i> RI	<pre> ↓ * (5') G A A T T C (3') C T T A A G * ↑ </pre>	<i>Pst</i> I	<pre> *↓ (5') C T G C A G (3') G A C G T C ↑* </pre>
<i>Eco</i> RV	<pre> ↓ (5') G A T A T C (3') C T A T A G ↑ </pre>	<i>Pvu</i> II	<pre> ↓ (5') C A G C T G (3') G T C G A C ↑ </pre>
<i>Hae</i> III	<pre> ↓* (5') G G C C (3') C C G G *↑ ↓ </pre>	<i>Tth</i> 111I	<pre> ↓ (5') G A C N N N G T C (3') C T G N N N C A G ↑ </pre>

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation of the bacterial species

from which it is derived (e.g., *Bam* for *Bacillus amyloliquefaciens*, *Eco* for *Escherichia coli*). The Roman numerals included in the enzyme names (e.g., *Bam*HI) distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species rather than the type of restriction enzyme.

LA SPECIFICITÀ DI ALCUNI SISTEMI DI RESTRIZIONE DI TIPO II

Enzima	Fonte batterica	Sito di restrizione e metilazione ^a
<i>Bam</i> H1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G↓GATCC
<i>Bgl</i> II	<i>B. globiggi</i>	A↓GATCT
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓A ^m AATTC
<i>Eco</i> RII	<i>E. coli</i> R245	CC↓G ^m G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓C ^m C
<i>Hga</i> I	<i>H. gallinarum</i>	GACGCNNNNN↓
<i>Hha</i> I	<i>H. haemolyticus</i>	G ^m CG↓C
<i>Hind</i> II	<i>H. influenzae</i> Rd	GTPy↓Pu ^m AC
<i>Hind</i> III	<i>H. influenzae</i> Rd	A↓AG ^m CTT
<i>Hin</i> fI	<i>H. influenzae</i> Rf	G↓ANTC
<i>Hpa</i> I	<i>H. parainfluenzae</i>	GTT↓AAC
<i>Hpa</i> II	<i>H. parainfluenzae</i>	C↓C ^m GG
<i>Msp</i> I	<i>Moraxella</i> sp.	C↓CGG
<i>Not</i> I	<i>Nocardia rubra</i>	GC↓GGCCGC
<i>Ple</i> I	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	GAGTCNNNNN↓
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA↓G
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	G↓TCGAC
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i> Sb	CCC↓G ^m GG
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	T↓CTAGA

Tipo III

Esso ha due subunità per le attività nucleasica e metilasiaca,

si sposta lungo il DNA senza consumo di ATP;

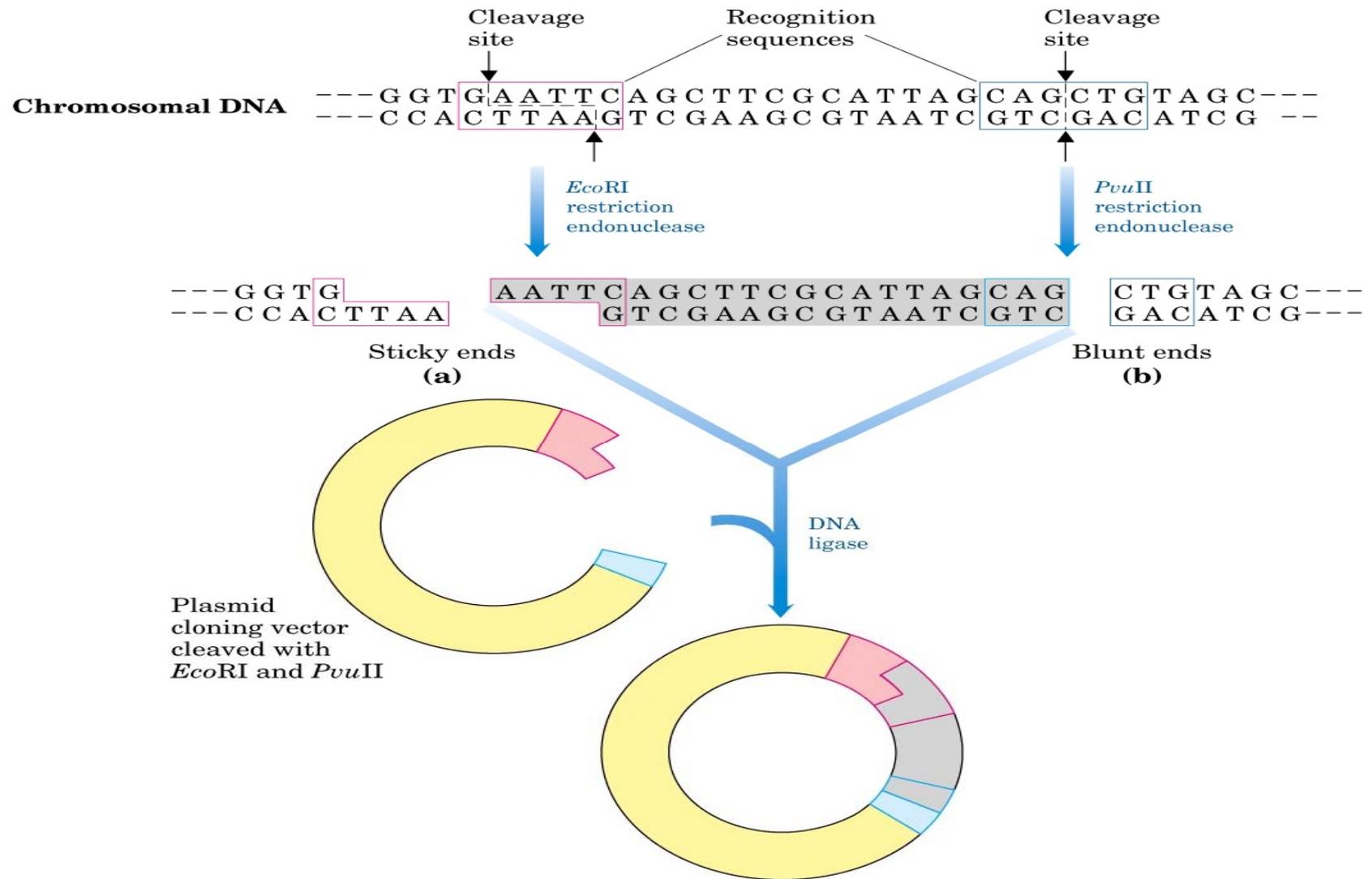
modifica solo un filamento di DNA ed ha un sito di taglio **relativamente vicino** al sito di riconoscimento (**24-26 bp**).

LE ESTREMITÀ COESIVE E NON COESIVE

Alcune endonucleasi di restrizione scindono entrambe le catene di DNA, lasciando basi appaiate in entrambe le estremità: tali estremità vengono chiamate **estremità non coesive**;

altre operano tagli obliqui, lasciando così due o quattro nucleotidi non appaiati in ciascuna estremità: **estremità coesive o appiccicose**.

LA SCISSIONE DI MOLECOLE DI DNA IN FRAMMENTI AD OPERA DI ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE



IL MECCANISMO D'AZIONE
DELL'ENDONUCLEASI **EcoRI**
(UN ENZIMA DI RESTRIZIONE DEL TIPO II)

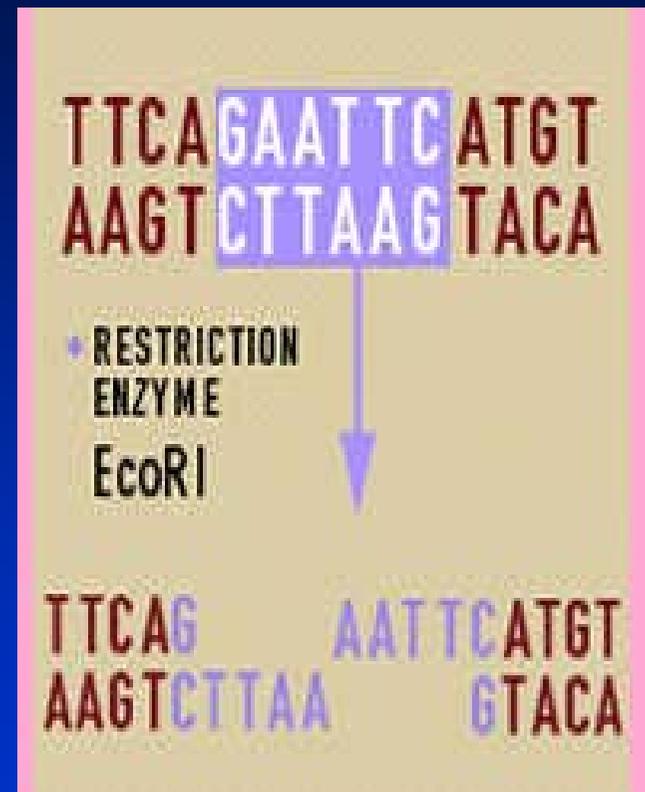
IL MECCANISMO D'AZIONE DELL'ENDONUCLEASI EcoRI

L'enzima è un omodimero (subunità di 31 KDa ciascuna),

si lega al DNA in modo che il suo asse di simmetria coincida con l'asse di simmetria del sito bersaglio del DNA;

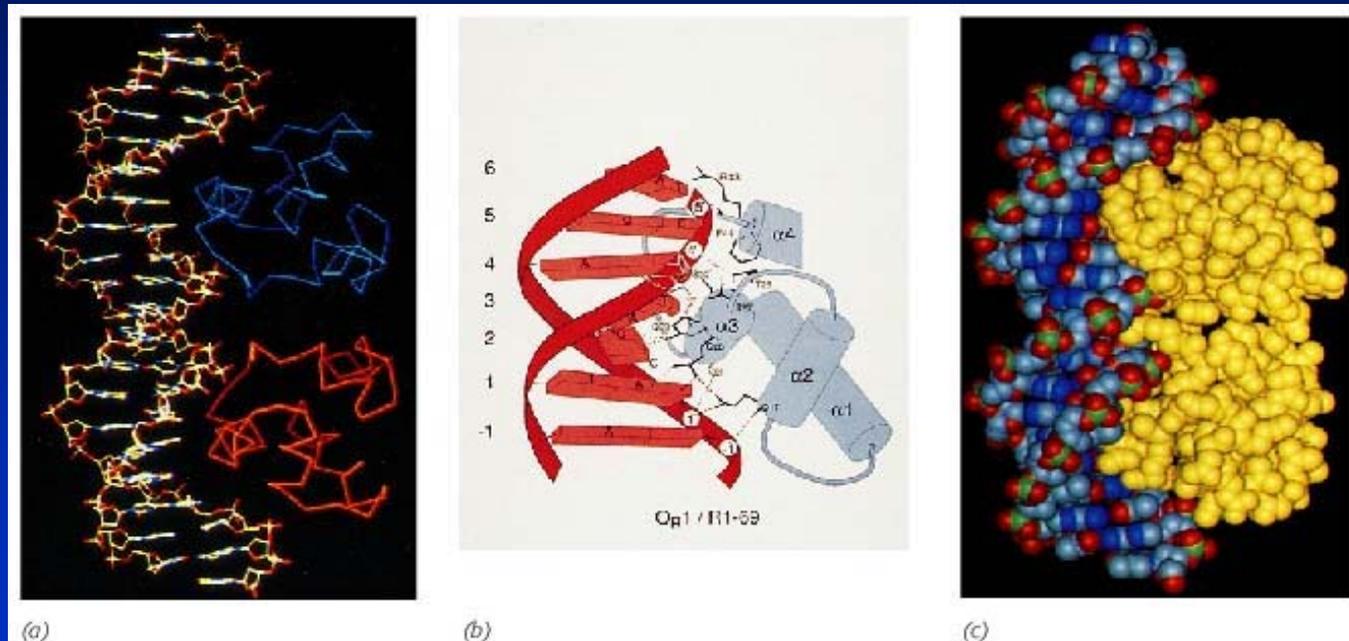
scivola lungo la scanalatura principale, piegando il DNA in modo transitorio, creando una **neoangolatura** nella doppia elica e cercando coppie di **GAA** con una simmetria simile a quella dell'enzima,

non svolge la doppia elica del DNA.



IL MECCANISMO D'AZIONE DELL'ENDONUCLEASI EcoRI

Il DNA contiene due tipi di scanalature, chiamate **scanalatura principale** e **scanalatura secondaria**, che si formano poiché i legami glicosidici di una coppia di basi azotate non sono diametralmente opposti.

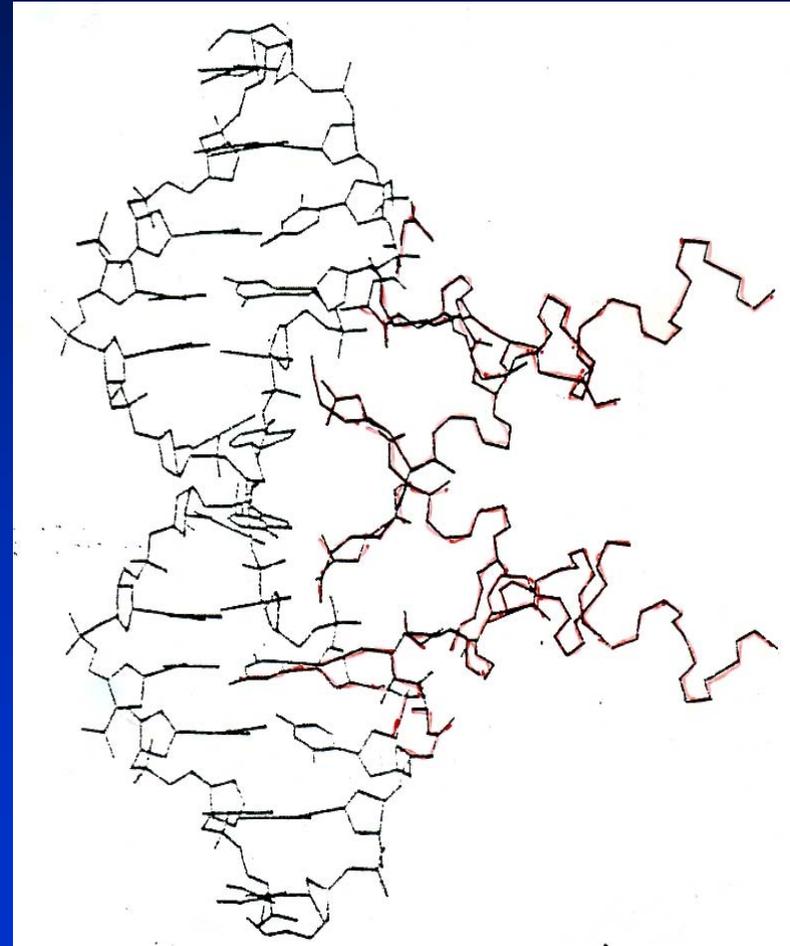


La **neoangolatura**, causata dall'enzima, allarga la scanalatura principale del DNA, con il conseguente ingresso di **α eliche** che verificano l'identità delle basi azotate; le basi azotate sono lette con altissima precisione.

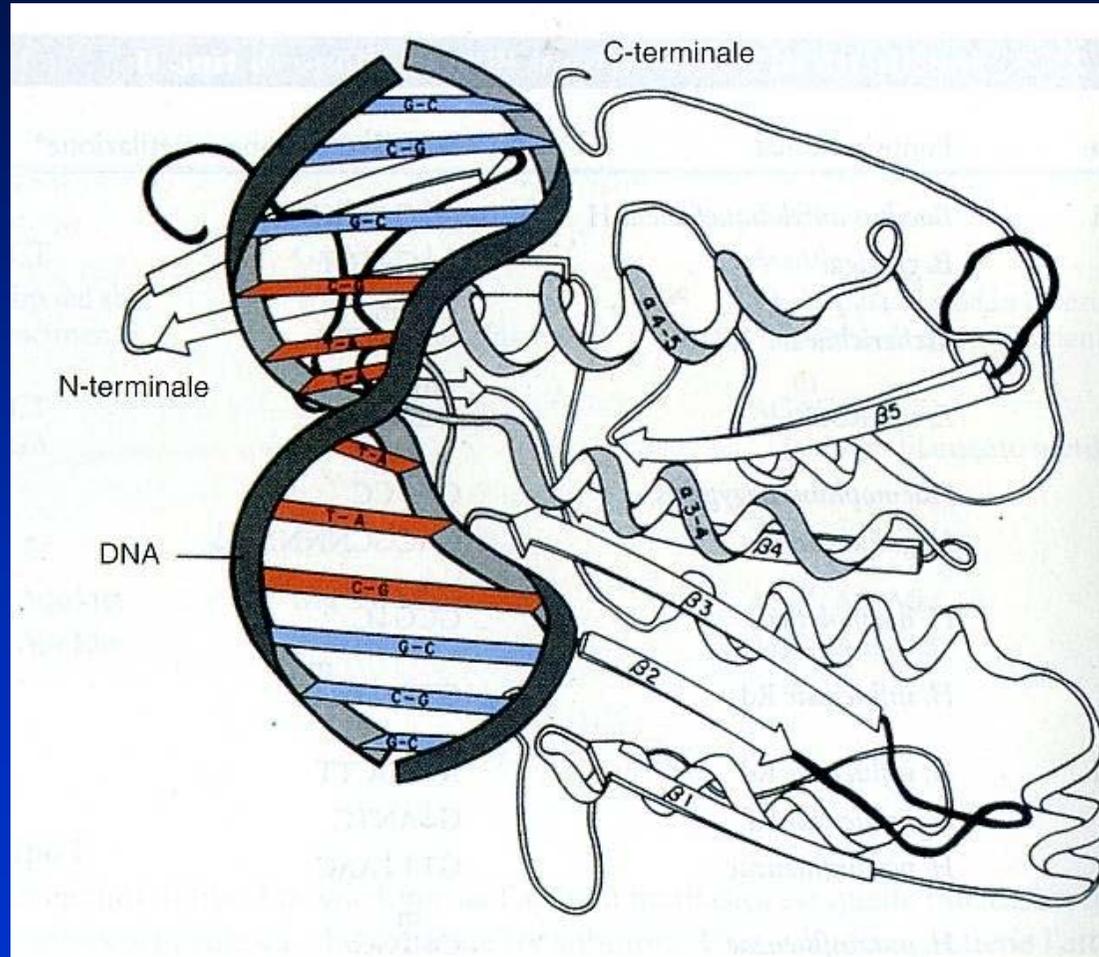
IL MECCANISMO D'AZIONE DELL'ENDONUCLEASI EcoRI

Quattro α eliche (2 per ogni subunità dell'enzima) entrano nella scanalatura principale allargata alla ricerca del **sito bersaglio palindromo**.

Ciascuna subunità dell'enzima riconosce la propria sequenza bersaglio **GAA** ed è dotata di un **"braccio"** N-terminale che avvolge e trattiene il DNA.



UNA DELLE 2 SUBUNITA' IDENTICHE DELLA NUCLEASI EcoRI IN COMPLESSO CON IL PROPRIO DNA SUBSTRATO

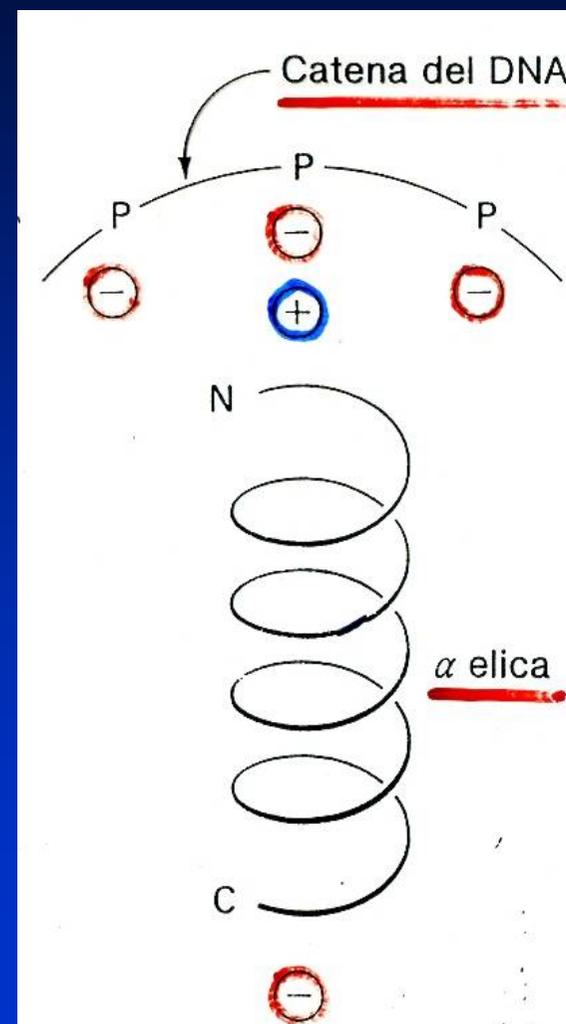


IL MECCANISMO D'AZIONE DELL'ENDONUCLEASI EcoRI

Ogni α elica é un **dipolo** con il terminale amminico positivo.

Le 4 α eliche delle 2 subunità parallele sono attratte dai gruppi fosforici della catena del DNA,

questo facilita lo scorrimento dell'**endonucleasi** lungo la scanalatura principale del DNA, fino a **trovare** e **digerire** la sequenza bersaglio.



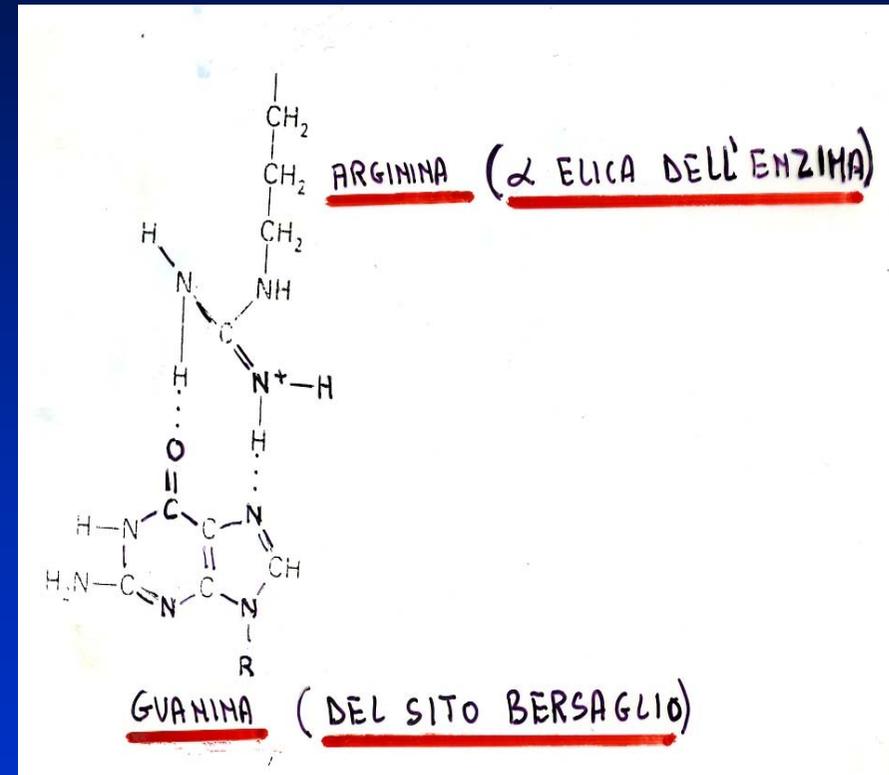
IL MECCANISMO D'AZIONE DELL'ENDONUCLEASI EcoRI

La **specificità** di sequenza enzima-substrato é data da **12** legami idrogeno.

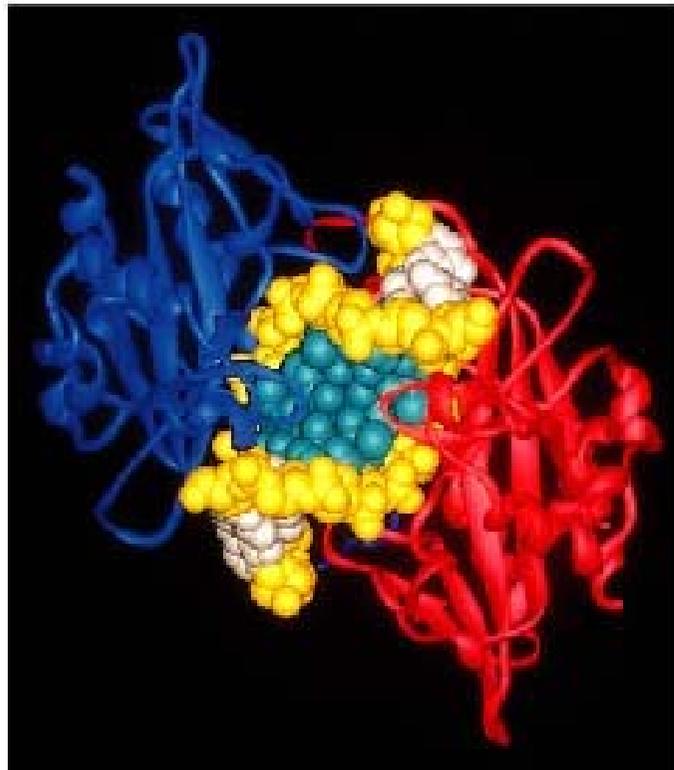
Ogni subunità ha **una arginina** (di una α elica) che forma 2 legami idrogeno con una **guanina** del sito bersaglio,

una seconda α elica ha **un'arginina ed un glutammato** che formano 4 leg. H con le **adenine** adiacenti della sequenza riconosciuta;

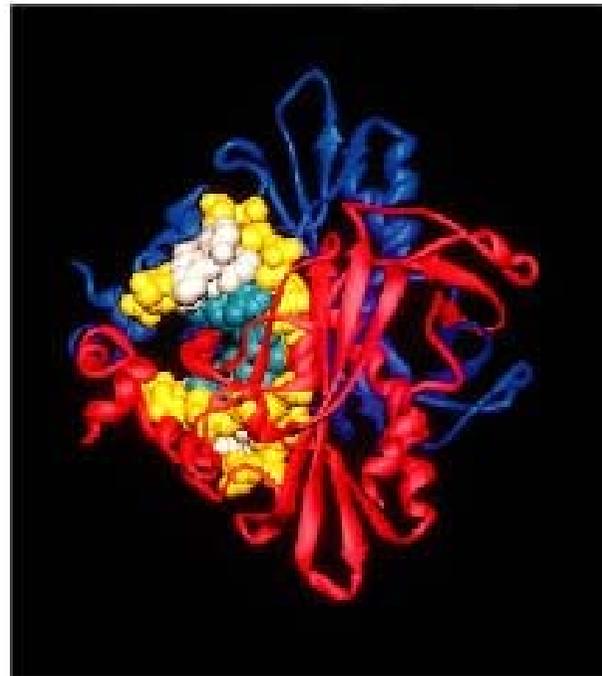
si formano in totale **12 leg. H** tra l'enzima (2 subunità) ed il sito bersaglio, che consentono la sua digestione.



LA STRUTTURA A RAGGI X DELL'ENDONUCLEASI ECORI COMPLESSATA CON IL DNA.



(a)



(b)

LA TRASCRITTASI INVERSA

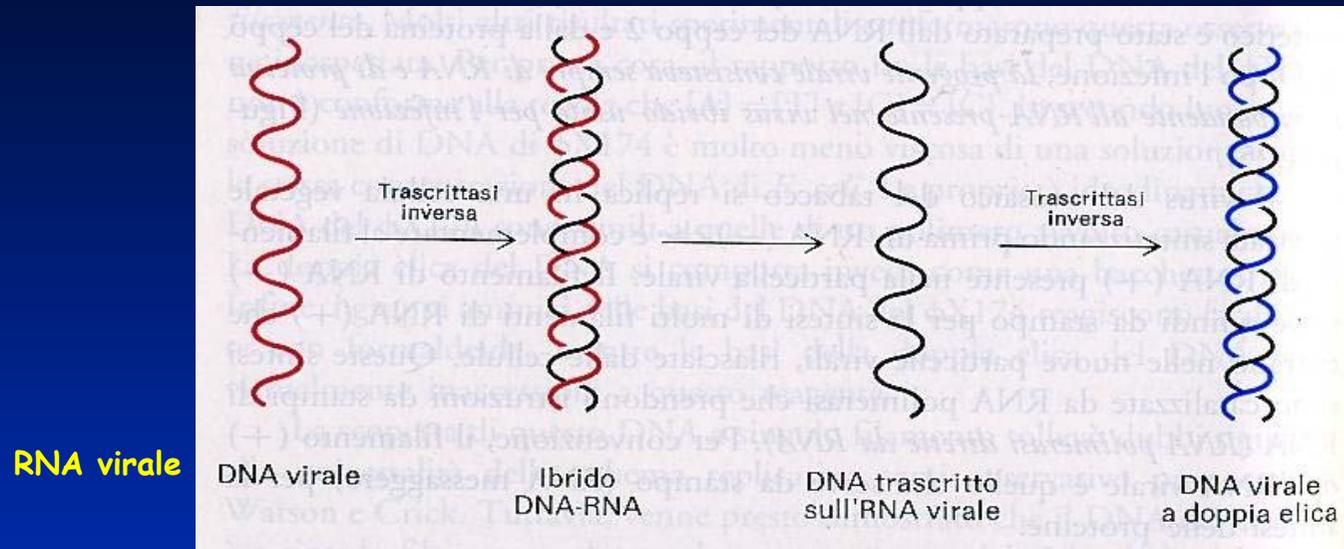
LA TRASCRIPTASI INVERSA

È una DNA polimerasi, **diretta dall'RNA**, presente in alcuni virus di tessuti animali;

nell'infezione, il genoma virale ad RNA a singola elica (lungo circa 10000 nucleotidi) e l'enzima **penetrano** nella cellula ospite,

la trascrittasi inversa **sintetizza** il DNA complementare all'RNA virale.

I VIRUS A RNA



La trascrittasi inversa svolge tre tipi di reazioni:

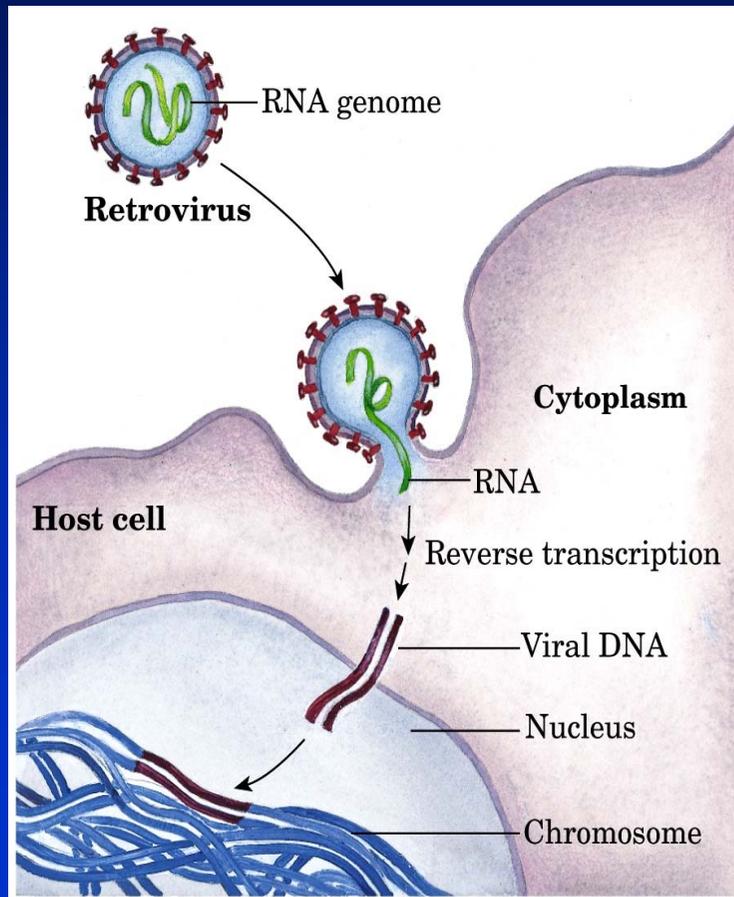
1. sintesi di DNA (-) diretta da RNA (+)
2. idrolisi di RNA (+)
3. sintesi di DNA (+) diretta da DNA (-).

LA TRASCRIPTASI INVERSA

Essa **degrada** la catena di RNA dell'ibrido RNA-DNA e la sostituisce con DNA,

la doppia elica di DNA virale può **integrarsi** nel genoma della cellula ospite ed in particolari condizioni vengono **attivati** i suoi geni quiescenti, che **generano** nuovi virus.

L'INFEZIONE RETROVIRALE DI UNA CELLULA DI MAMMIFERO E L'INTEGRAZIONE DEL RETROVIRUS NEL CROMOSOMA DELL'OSPITE.



Penetrano nella cellula ospite anche la trascrittasi inversa ed un tRNA appaiato con l'RNA virale;

i virus contenenti la trascrittasi inversa sono chiamati anche **retrovirus**.

I RETROVIRUS

Essi possiedono tre geni:

GAG (Group Associated Antigen)

codifica per una poliproteina che, dopo una scissione, sintetizza le proteine centrali del virione,

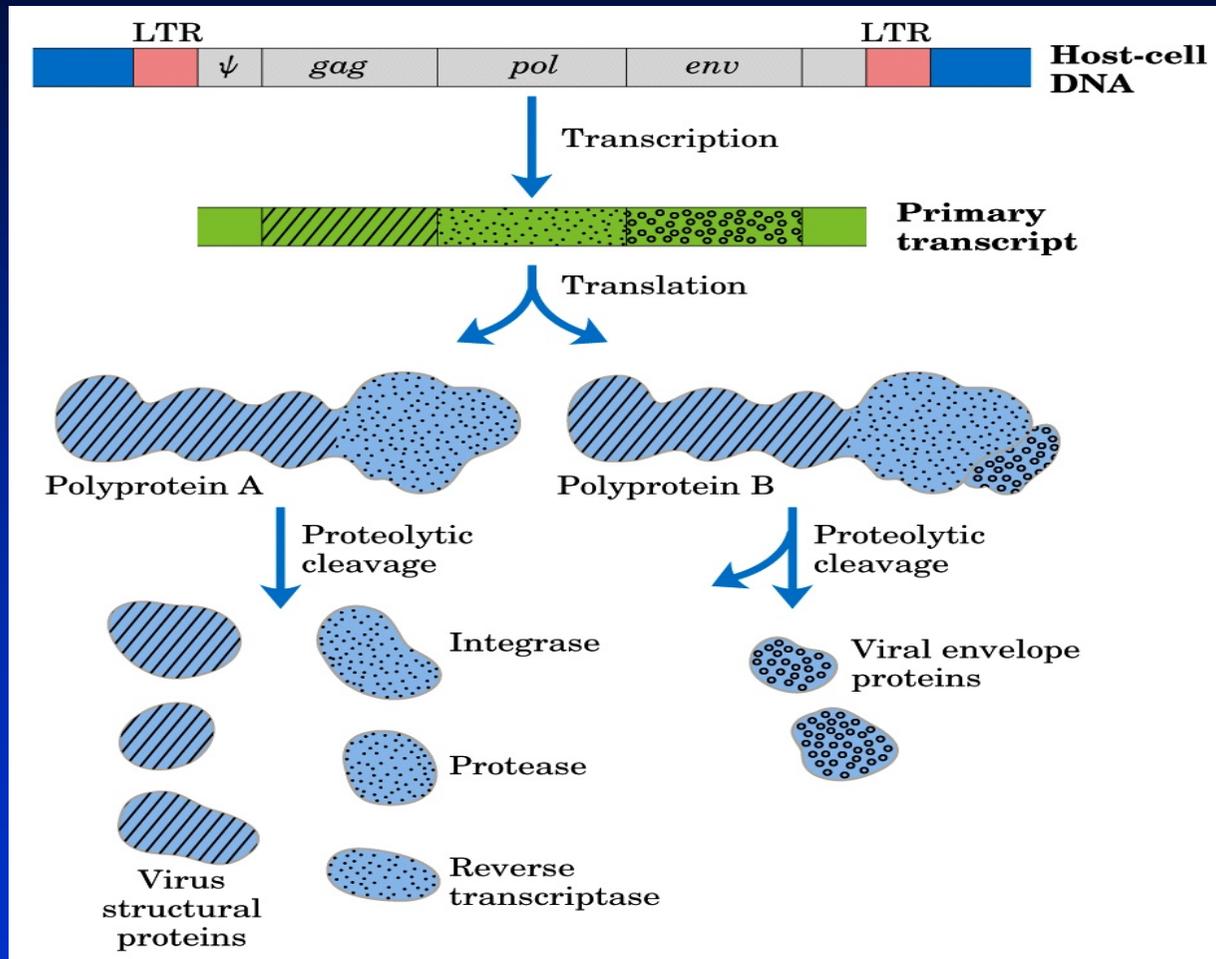
POL

codifica per la polimerasi virale, ossia la trascrittasi inversa e l'integrasi,

ENV

codifica per la glicoproteina principale dell'involucro virale.

LA STRUTTURA ED I PRODOTTI GENICI DI UN GENOMA DI RETROVIRUS INTEGRATO



Le lunghe sequenze ripetitive terminali (**LTR**) possiedono le sequenze necessarie alla regolazione e all'inizio della trascrizione.

LA TRASCRIPTASI INVERSA

La trascrittasi inversa contiene Zn^{2+} . Essa richiede un **primer** per iniziare la sintesi di DNA, che è un **tRNA** racchiuso nella particella virale (ottenuto in una precedente infezione);

la trascrittasi inversa sintetizza DNA in direzione **5'→3'**, non ha esonucleasi **3'→5'**, quindi presenta una frequenza di errori relativamente alta,

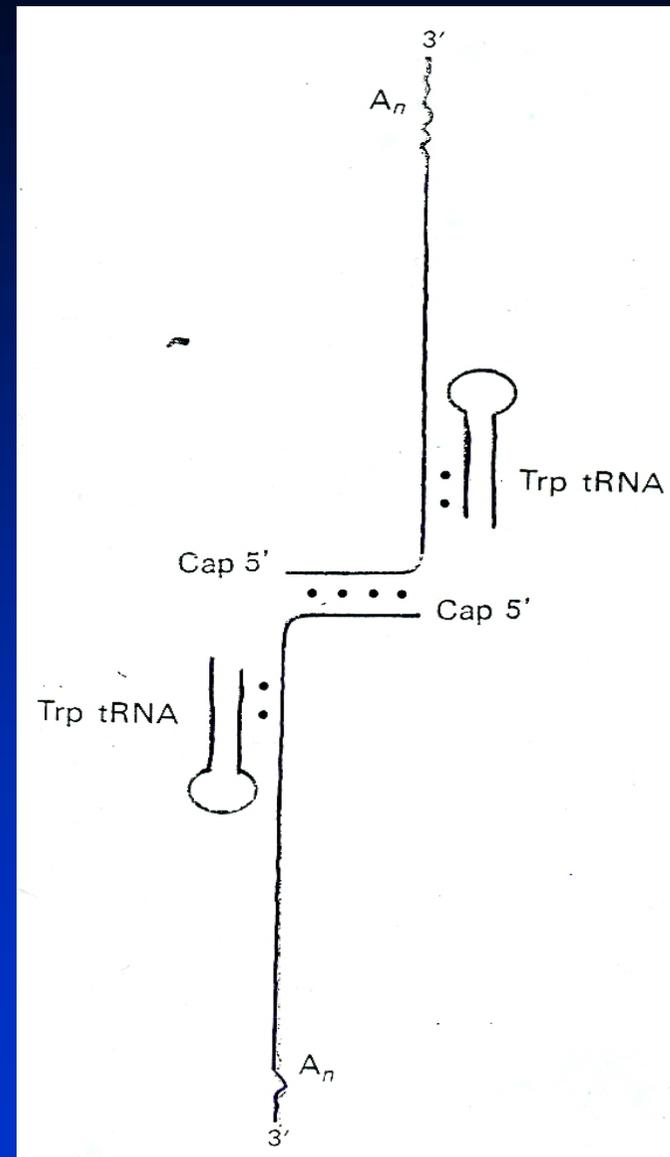
una conseguenza è una più rapida evoluzione, che può essere la causa della frequente comparsa di nuovi ceppi di **virus patogeni**.

IL GENOMA DEL VIRUS DEL SARCOMA AVIARIO

Due molecole identiche di RNA(+) sono legate non covalentemente,

le estremità 5' sono provviste di **Cap**, le estremità 3' hanno code di **poli A**;

una molecola di tRNA (**primer**) é accoppiata a ciascuna molecola di RNA.



IL DNA RICOMBINANTE

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

Questa tecnologia ha contribuito a definire le frontiere presenti e future della biochimica e ha permesso di illustrare numerosi ed importanti principi biochimici.

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

Da tempo si studiano le leggi che **governano** i principali processi biochimici, ad es.:

la divisione cellulare,

la risposta immunitaria,

i processi di sviluppo degli eucarioti,

la vista,

il gusto,

il differenziamento cellulare,

i processi cognitivi del cervello,

ecc.

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

Oggi, non solo si é in grado di capire la vita, ma si può **modificarla**, attraverso questa tecnologia, che fornisce mezzi molto potenti per analizzare ed alterare **geni e proteine**.

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

La fonte più fertile di informazioni molecolari su questi processi risiede nel deposito di informazioni della cellula: il suo **DNA**,

ma le voluminose dimensioni di un genoma costituiscono un problema quasi insormontabile:

come è possibile identificare
e studiare un particolare gene
che codifica una proteina
tra i 100'000 geni che compongono
il genoma di mammifero?

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

A metà degli anni '70, Berg, Boyer e Cohen fornirono le tecniche per la **localizzazione**, **l'isolamento**, **la preparazione** e **lo studio** di piccoli segmenti di DNA, derivati da cromosomi molto più grandi.

Nel loro insieme queste tecniche sono note come

"IL CLONAGGIO DEL DNA";

clonare significa produrre copie identiche.

I MOMENTI PRINCIPALI NELLO SVILUPPO DELLA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

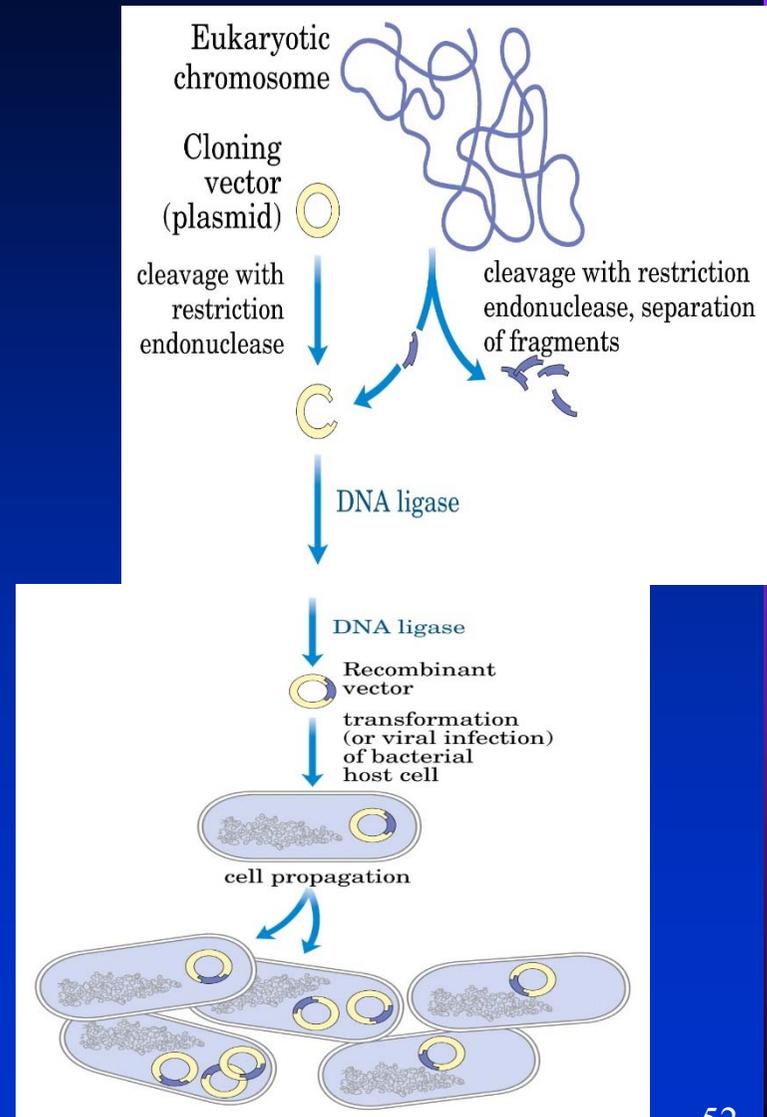
1869	Miescher isola il DNA per la prima volta.
1944	Avery fornisce la prova che il DNA, e non le proteine, porta le informazioni genetiche durante la trasformazione batterica.
1953	Watson e Crick propongono il modello a doppia elica per la struttura del DNA basato su risultati ai raggi X di Franklin e Wilkins .
1957	Kornberg scopre la DNA polimerasi, l'enzima usato oggi per produrre sonde marcate di DNA.
1961	Marmur e Doty scoprono la rinaturazione del DNA, stabilendo la specificità e la fattibilità delle reazioni di ibridizzazione degli acidi nucleici.
1962	Arber fornisce la prima prova dell'esistenza delle nucleasi di restrizione, portando alla loro successiva purificazione e uso nella caratterizzazione di sequenze di DNA da Nathans e H. Smith .
1966	Nirenberg, Ochoa e Khorana chiariscono il codice genetico.
1967	Gellert scopre la DNA ligasi, l'enzima usato per unire i frammenti di DNA.
1972-1973	Vengono sviluppate le tecniche di clonaggio del DNA nei laboratori di Boyer, Cohen, Berg e loro colleghi alla università di Stanford e alla università di California a San Francisco.
1975	Southern sviluppa l'ibridizzazione dopo trasferimento da gel per la rivelazione di sequenze specifiche di DNA.
1975-1977	Sanger e Barrell e Maxam e Gilbert sviluppano metodi rapidi per sequenziare il DNA.
1981-1982	Palmiter e Brinster producono topi transgenici; Spradling e Rubin producono moscerini della frutta transgenici.
1985	Mullis e i suoi collaboratori inventano la reazione a catena della polimerasi (PCR).

IL CLONAGGIO

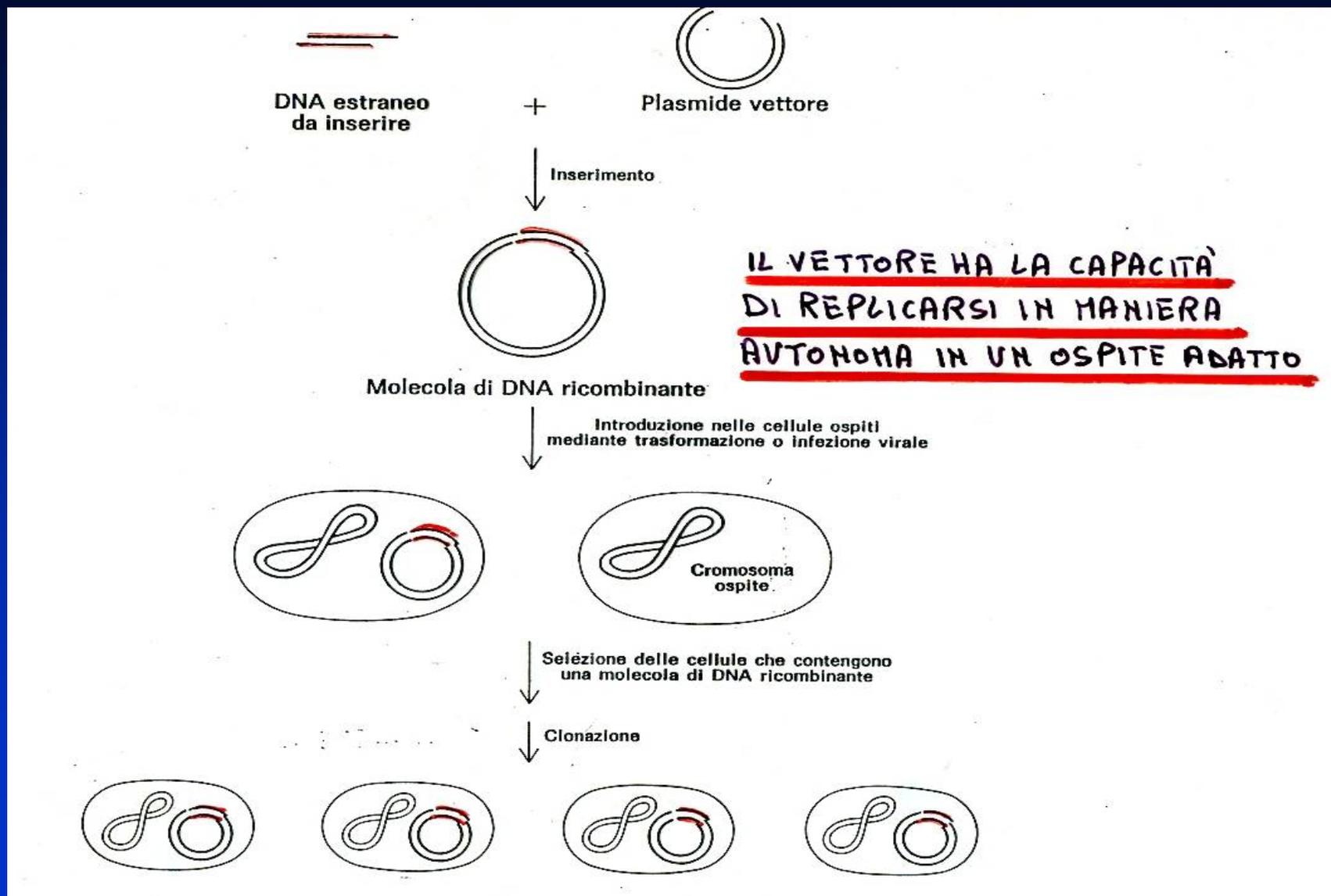
Il clonaggio del DNA consiste nella **separazione** di uno specifico gene o segmento di DNA dal suo cromosoma e nell'**inserirlo** ad una piccola molecola di DNA che serve da trasportatore,

questo permette una **elevata replicazione** del DNA modificato, migliaia o addirittura milioni di volte;

il risultato é **un'amplificazione selettiva** di quel particolare gene o segmento di DNA.



L'ILLUSTRAZIONE SCHEMATICA DEL CLONAGGIO DEL DNA



IL CLONAGGIO

Il clonaggio di un segmento di DNA, sia procariotico sia eucariotico, utilizza le seguenti cinque metodologie generali:

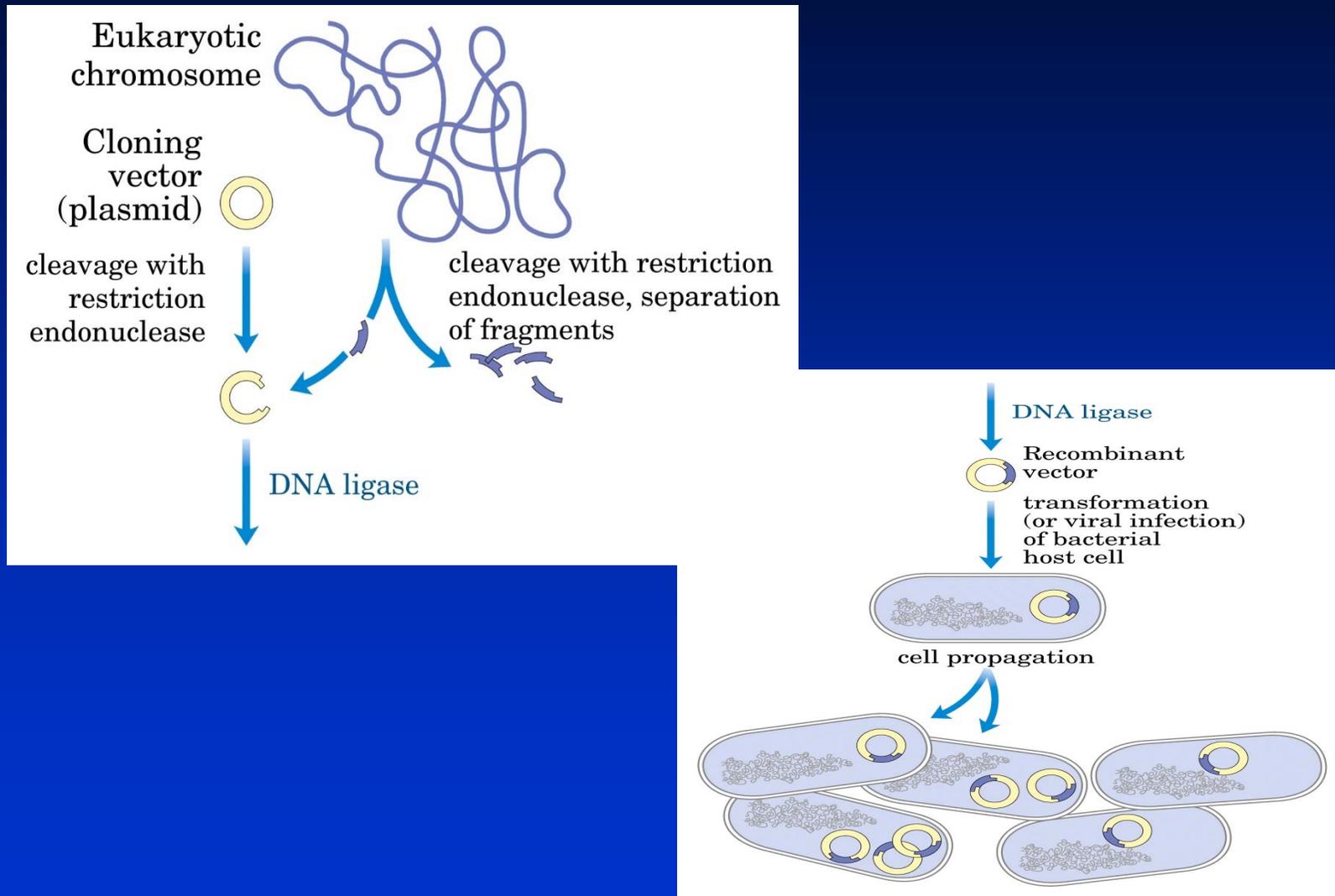
- 1) le **endonucleasi di restrizione** (sequenza-specifiche) con funzione di "forbici molecolari",
- 2) le **DNA ligasi** che uniscono covalentemente due frammenti di DNA,
- 3) la selezione di una piccola molecola di DNA capace di autoreplicarsi: infatti i segmenti di DNA da clonare sono legati a **plasmidi** o a **DNA virali (vettori di clonaggio)**.

IL CLONAGGIO

Queste molecole di DNA composite, contenenti segmenti di diversa derivazione (vettore di clonaggio e DNA da clonare) uniti in modo covalente, sono chiamate **DNA ricombinanti**,

- 4) un metodo per **trasferire** il DNA ricombinante da una provetta ad una cellula ospite, che fornisce **l'apparato enzimatico** per la replicazione del DNA,
- 5) metodi per **selezionare o identificare le cellule ospiti** che contengano il DNA ricombinante.

LO SCHEMA DEL CLONAGGIO DEL DNA



GLI ENZIMI PIÙ IMPORTANTI UTILIZZATI NELLA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

table 29-1

Some Enzymes Used in Recombinant DNA Technology

Enzyme(s)	Function
Type II restriction endonucleases	Cleave DNAs at specific base sequences
DNA ligase	Joins two DNA molecules or fragments
DNA polymerase I (<i>E. coli</i>)	Fills gaps in duplexes by stepwise addition of nucleotides to 3' ends
Reverse transcriptase	Makes a DNA copy of an RNA molecule
Polynucleotide kinase	Adds a phosphate to the 5'-OH end of a polynucleotide to label it or permit ligation
Terminal transferase	Adds homopolymer tails to the 3'-OH ends of a linear duplex
Exonuclease III	Removes nucleotide residues from the 3' ends of a DNA strand
Bacteriophage λ exonuclease	Removes nucleotides from the 5' ends of a duplex to expose single-stranded 3' ends
Alkaline phosphatase	Removes terminal phosphates from either the 5' or 3' end (or both)

IL CLONAGGIO GENICO: I PASSAGGI PRINCIPALI

1. La costruzione di una molecola ricombinante,
2. l'introduzione nelle cellule ospiti della molecola ricombinante,
3. la selezione delle cellule che contengono il DNA ricombinante.

1. LA COSTRUZIONE DI UNA MOLECOLA RICOMBINANTE

Il frammento di DNA di interesse é legato covalentemente ad un DNA vettore, che si replica in modo autonomo in un ospite adatto;

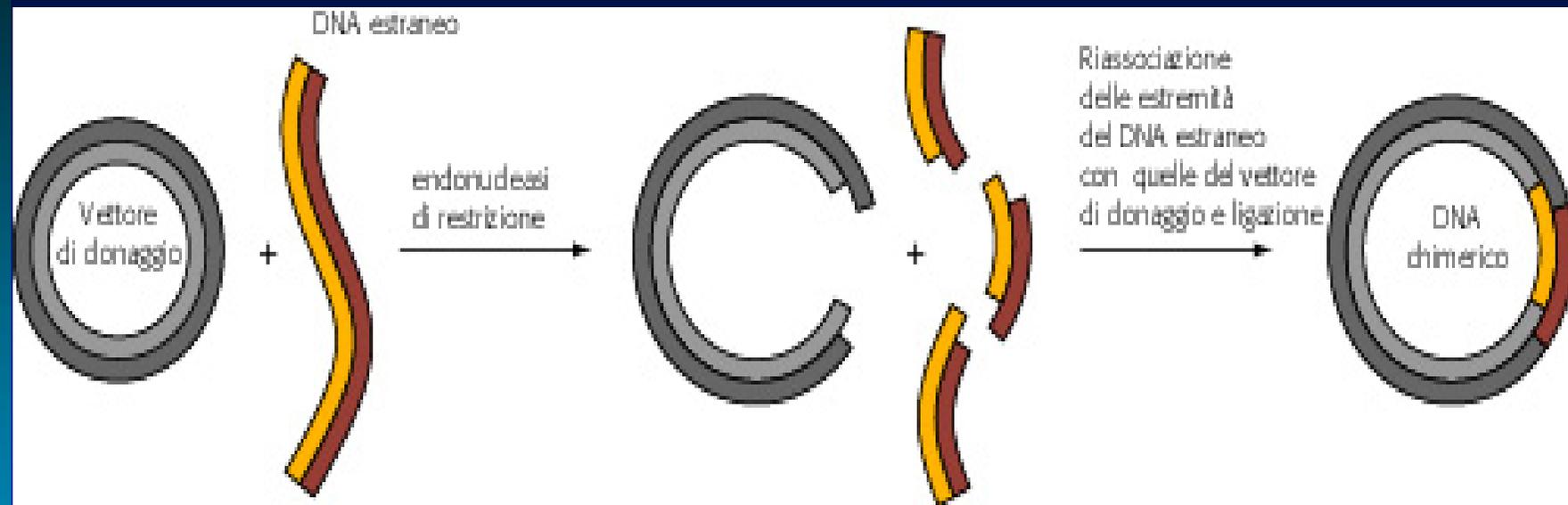
in *E.coli* si usano comunemente due tipi di vettori:
i plasmidi e i batteriofagi.

1. LA COSTRUZIONE DI UNA MOLECOLA RICOMBINANTE

I plasmidi sono piccole molecole extracromosomiali circolari di DNA presenti in molti batteri, che si replicano indipendentemente dal cromosoma principale e possono essere presenti in più copie per cellula;

i batteriofagi (fagi) sono virus in grado di replicarsi in una cellula batterica.

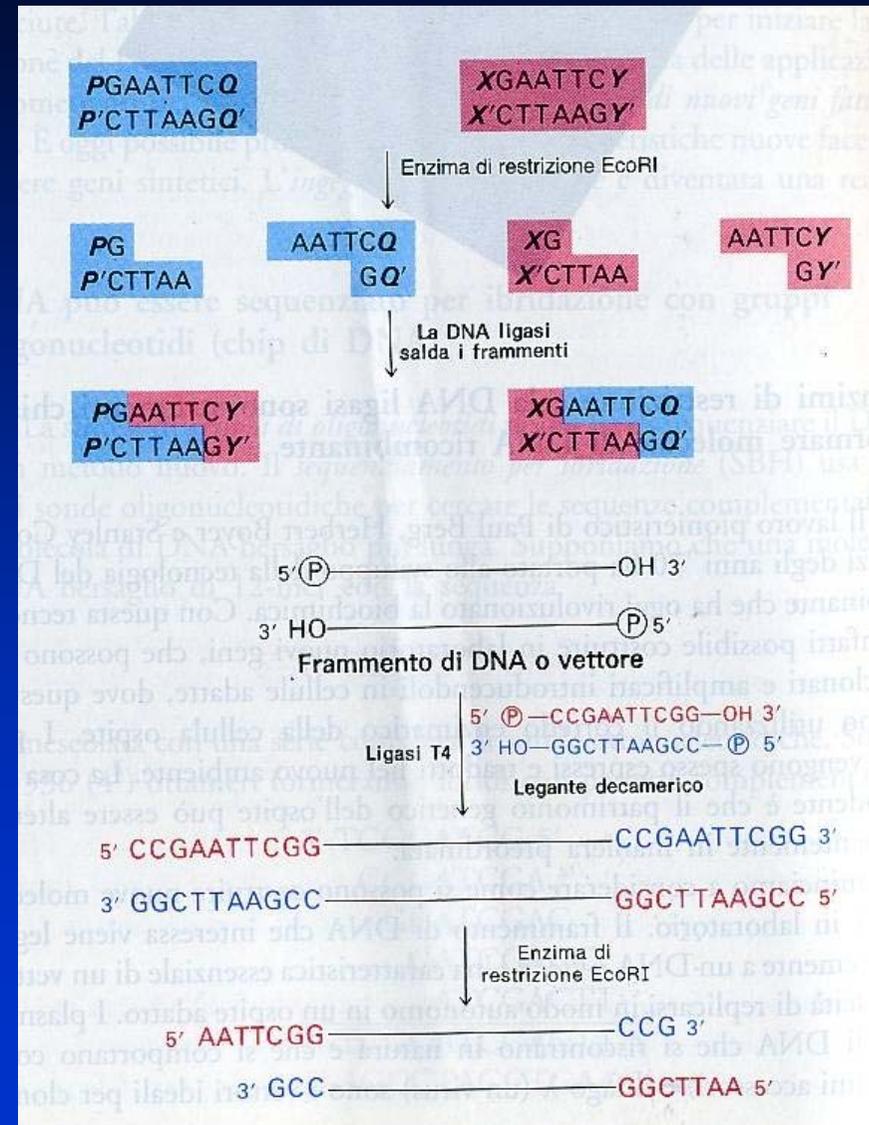
1. LA COSTRUZIONE DI UNA MOLECOLA RICOMBINANTE



Nella formazione del DNA ricombinante, i frammenti di DNA che interessano sono preparati usando lo stesso enzima di restrizione che ha aperto, ad esempio, il plasmide; molecole di DNA provenienti da qualsiasi fonte possono quindi essere unite, se hanno estremità adesive dello stesso tipo.

LA FORMAZIONE DI ESTREMITÀ COESIVE, CON L'AGGIUNTA E IL TAGLIO DI UN DNA DI UNIONE (LINKER) SINTETIZZATO CHIMICAMENTE

In questo modo é possibile aggiungere estremità corrispondenti ad un enzima di restrizione (es. **EcoRI**) a qualunque molecola di DNA.



2. L'INTRODUZIONE NELLE CELLULE OSPITI DELLA MOLECOLA RICOMBINANTE

La miscela di DNA é introdotta in batteri resi permeabili sia mediante trattamento con **cloruro di calcio**, seguito da shock termico, sia con l'applicazione di un **impulso elettrico**, ecc.,

una piccola percentuale di batteri va incontro a **trasformazione genica** (incorporazione di DNA che poi si replica nella cellula ricevente);

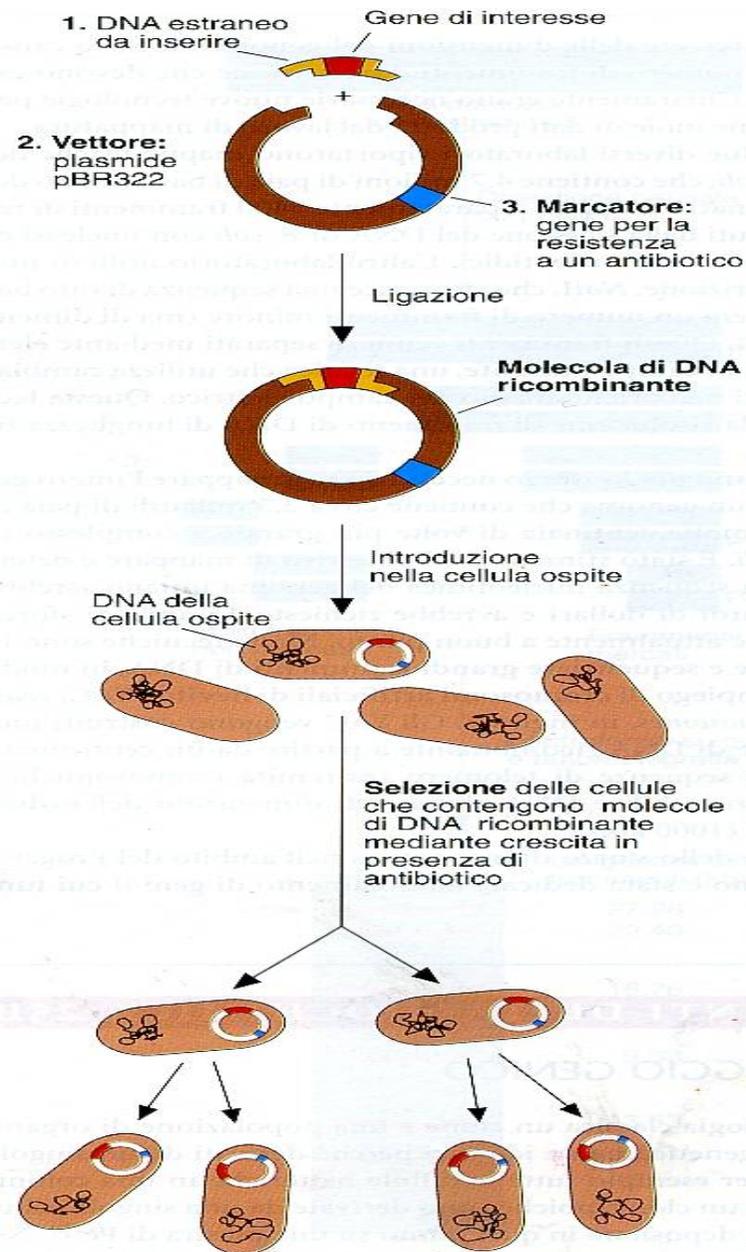
spesso si utilizzano ceppi **batterici mutanti**, che non degradano rapidamente il DNA estraneo.

3. LA SELEZIONE DELLE CELLULE

È necessaria una opportuna tecnica di **screening**, per l'identificazione dei batteri contenenti il gene clonato, in presenza di un forte eccesso di cellule che non lo contengono;

le cellule desiderate sono **selezionate** valutando ad es.
la resistenza ad un particolare farmaco,
la perdita della dipendenza da un elemento nutritivo,
la reazione di un A.C. specifico con il prodotto del gene clonato,
ecc.

Il clonaggio di un frammento di DNA in un vettore plasmidico e l'introduzione della molecola ricombinante in cellule batteriche.



I VETTORI PIU' UTILIZZATI:

il plasmide pBR322,

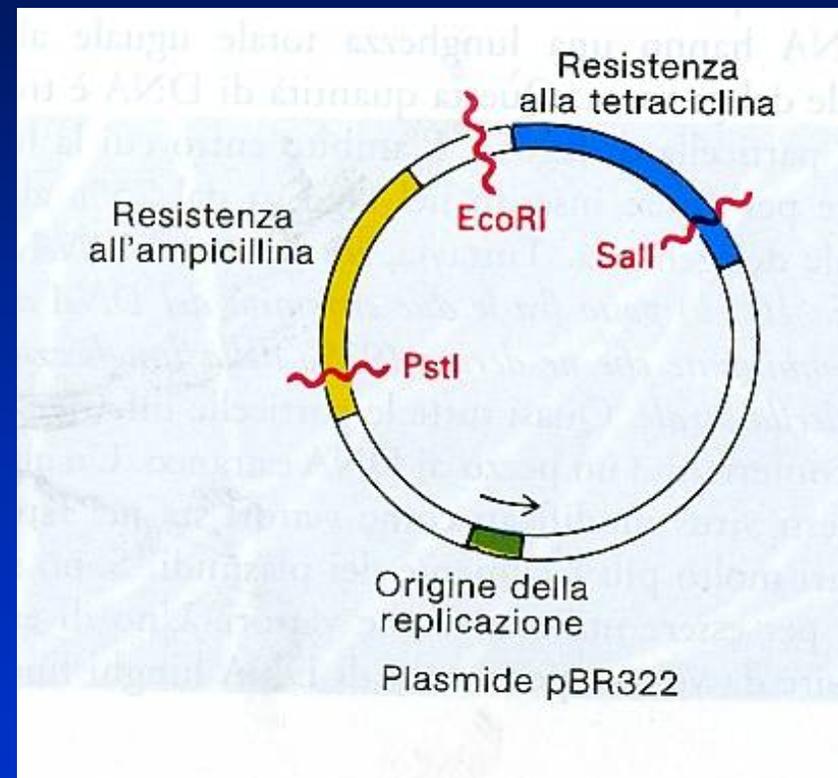
il batteriofago λ ,

i cosmidi.

IL PLASMIDE pBR322

Esso é un vettore plasmidico molto diffuso che é a sua volta una molecola di DNA ricombinante prodotta in vitro,

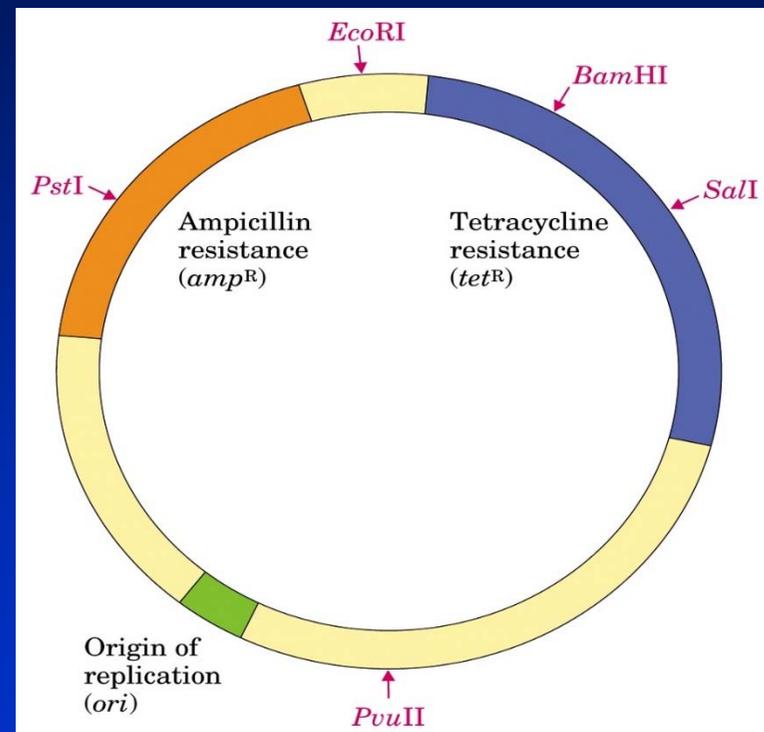
fu costruito da H. Boyer nel 1977 espressamente per il clonaggio in E.coli.



IL PLASMIDE pBR322

Il plasmide pBR322 è una molecola di DNA circolare contenente:

- 1) un'origine di replicazione (**ori**) proveniente da un plasmide naturale,
- 2) i geni per la resistenza agli antibiotici ampicillina (**amp^r**) e tetraciclina (**tet^r**),
- 3) i **siti di restrizione** (di taglio), localizzati entro questi due geni, quindi il DNA da clonare formerà un inserto che dividerà ed **inattiverà** il gene in questione.

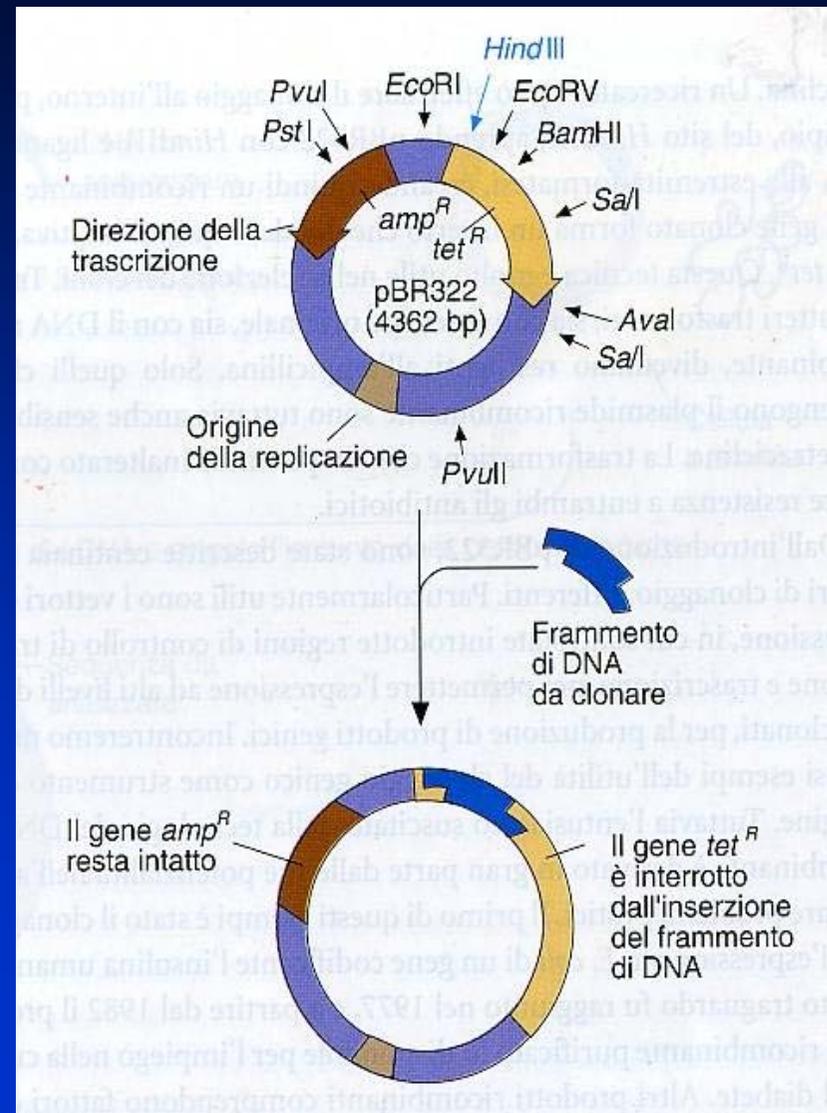


IL CLONAGGIO CON IL PLASMIDE pBR322

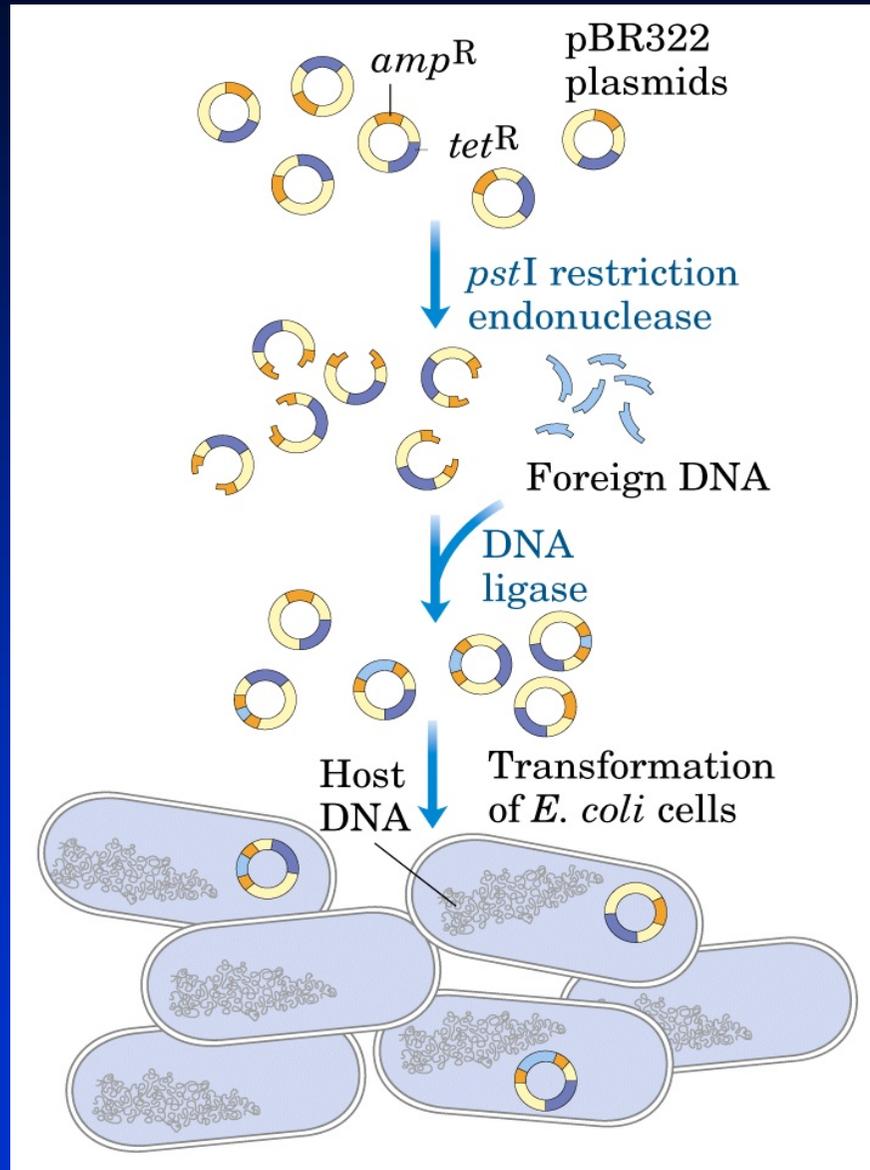
Se si effettua il clonaggio aprendo il **pBR322** con **HindIII**, si crea un **ricombinante** in cui il gene clonato forma un inserto che divide e quindi inattiva il **gene tet^R**,

questa tecnica é molto utile nella **selezione** dei cloni;

la trasformazione con un **plasmide inalterato** (senza il gene da clonare) conferisce resistenza ad entrambi gli antibiotici; solo quelli che contengono il **plasmide ricombinante** sono sensibili alla tetracilina (**inattivazione inserzionale**).



IL CLONAGGIO CON IL PLASMIDE pBR322



Se si apre il **pBR322** con l'endonucleasi **PstI**, esso interrompe ed inattiva il gene per la resistenza all'**ampicillina**,

si forma il DNA ricombinante

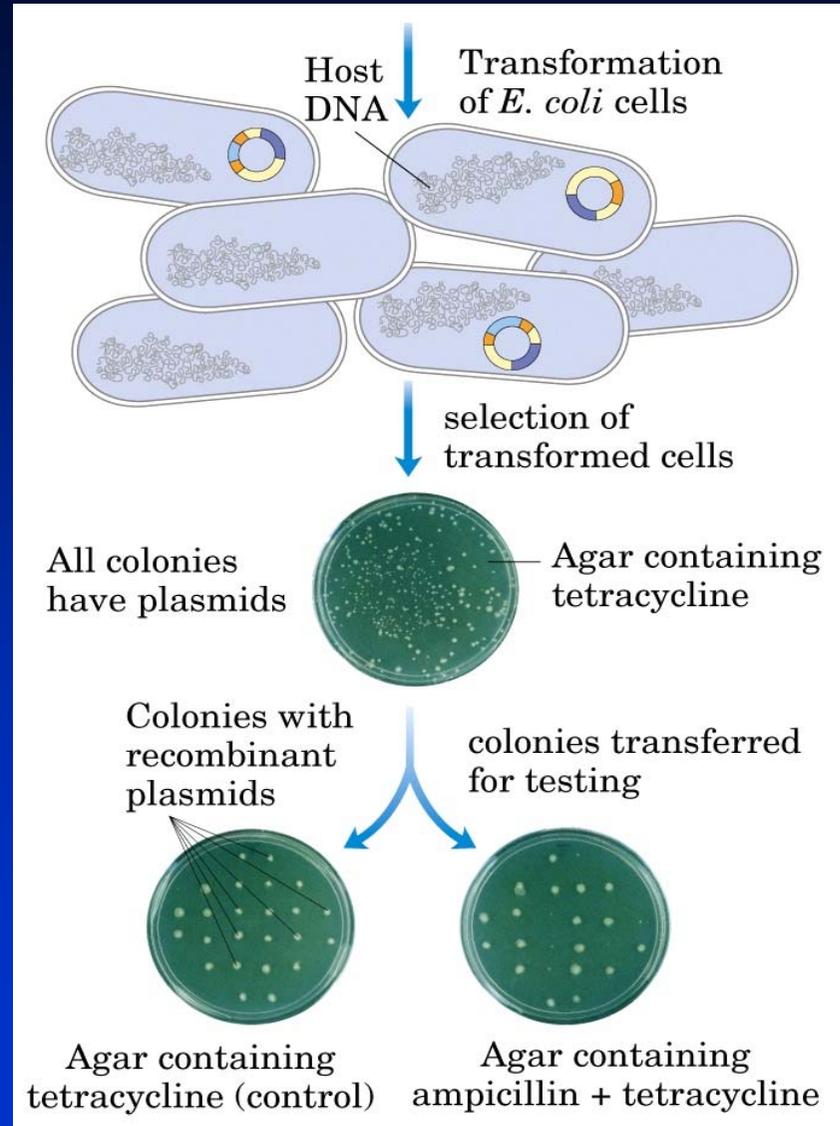
e avviene la trasformazione delle cellule di *E. coli*.

IL CLONAGGIO CON IL PLASMIDE pBR322

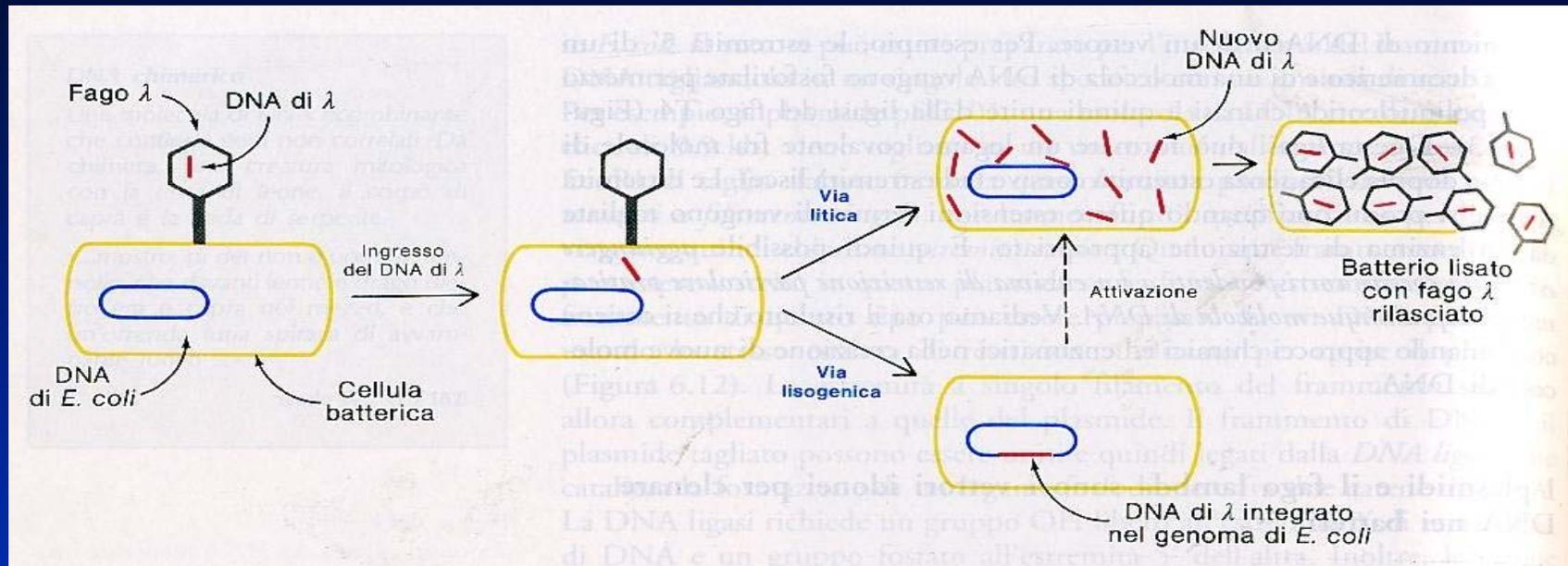
Si selezionano le colonie batteriche che hanno acquisito il plasmide su piastre contenenti **tetraciclina** (sono quelle che sopravvivono),

si trasferiscono per mezzo di anse sterili su piastre contenenti **ampicillina** per **selezionare** le cellule con il plasmide ricombinante (sono quelle che non sopravvivono perché è inattivo il **gene amp^R**);

per **colonia batterica** si intende l'insieme dei batteri che derivano da una cellula iniziale.



IL BATTERIOFAGO λ



Ha diversi stili di vita possibili:

è inattivo nella via lisogenica,

particolari condizioni ambientali attivano l'espressione del suo DNA, con formazione di una progenie di virus e la lisi dell'ospite;

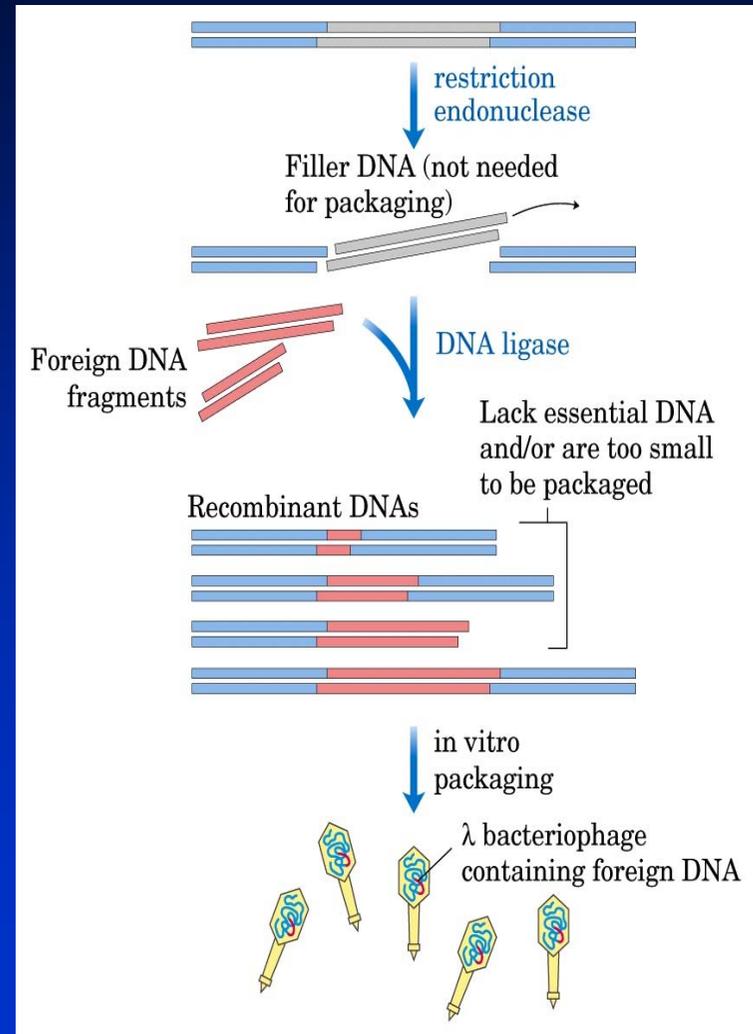
esso è un altro vettore di clonazione molto usato.

IL BATTERIOFAGO λ

Sono prodotti dei fagi λ che possono essere tagliati in **tre parti**: i geni essenziali per la riproduzione del batteriofago sono raggruppati alle estremità,

quindi la parte centrale (1/3) del genoma del batteriofago λ **non** è essenziale e può essere sostituita con **DNA eterologo**,

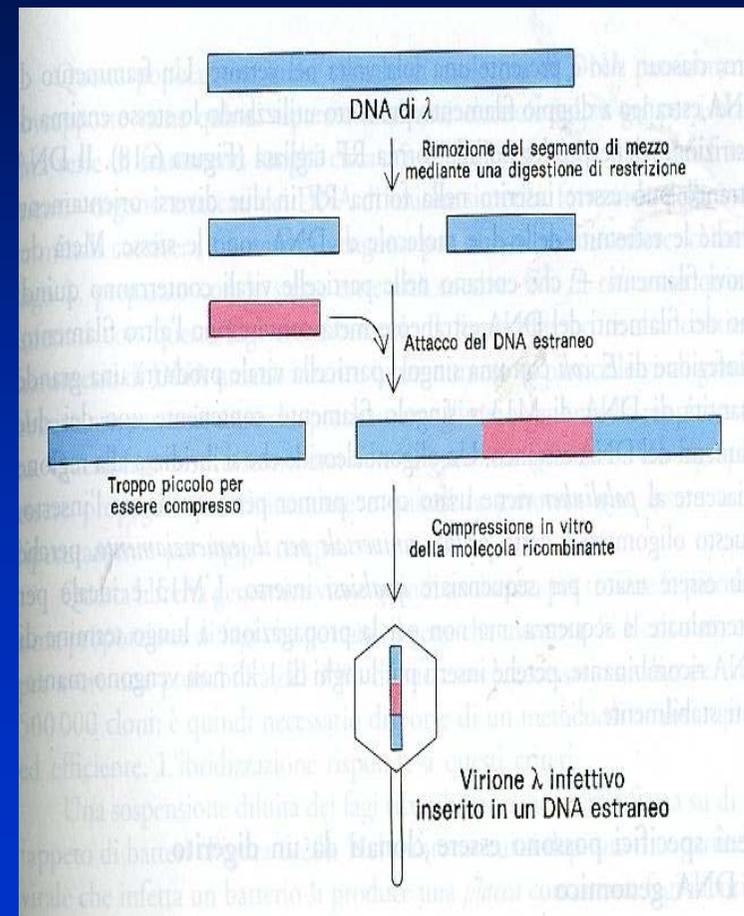
il DNA ricombinante può essere **"impaccato"** (inserito) in particelle virali infettive, solo se è lungo da 40000 a 50000 coppie di basi azotate.



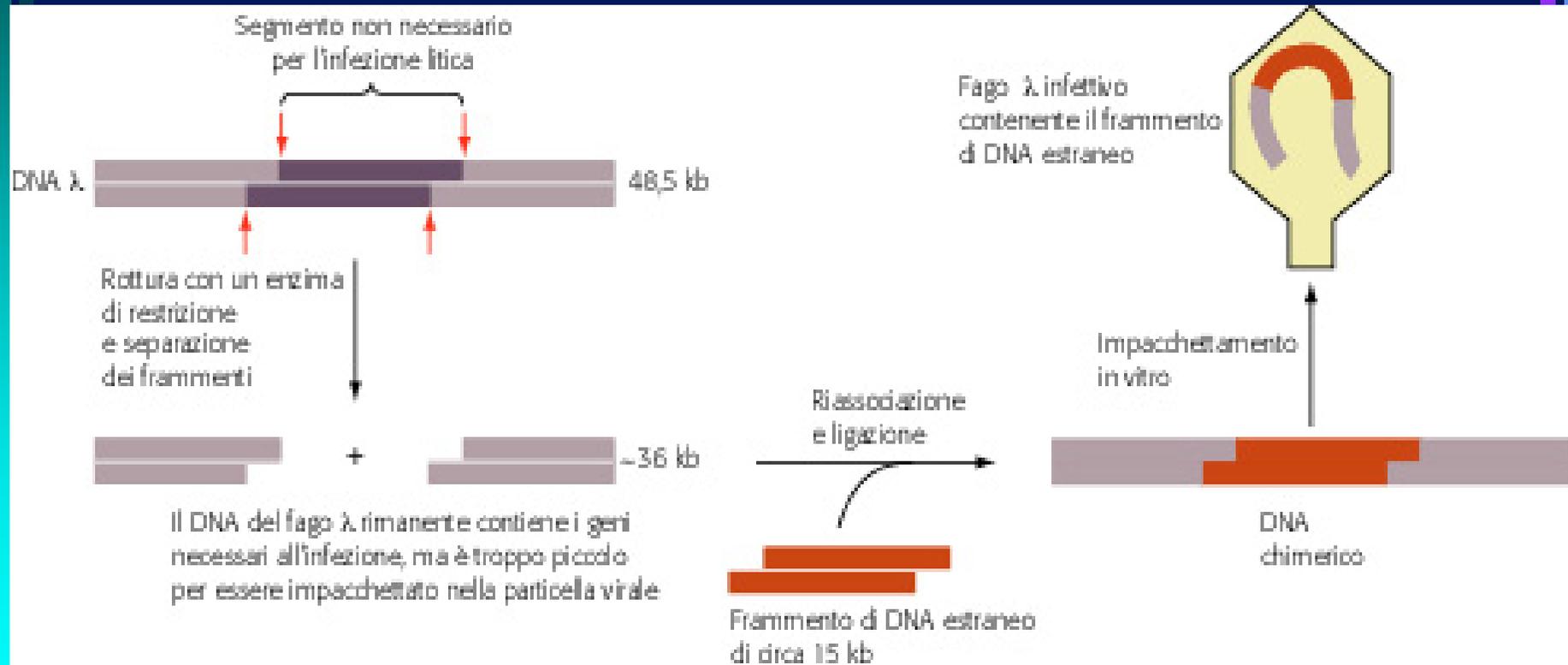
IL BATTERIOFAGO λ

I risultanti DNA ricombinanti possono così **impaccarsi** in particelle virali (impaccamento in vitro),

il vettore fagico é pronto per l'introduzione del DNA ricombinante nelle cellule di E.coli, dove esso si moltiplica **come un plasmide**.



LO SCHEMA RIASSUNTIVO DEL CLONAGGIO CON IL BATTERIOFAGO λ

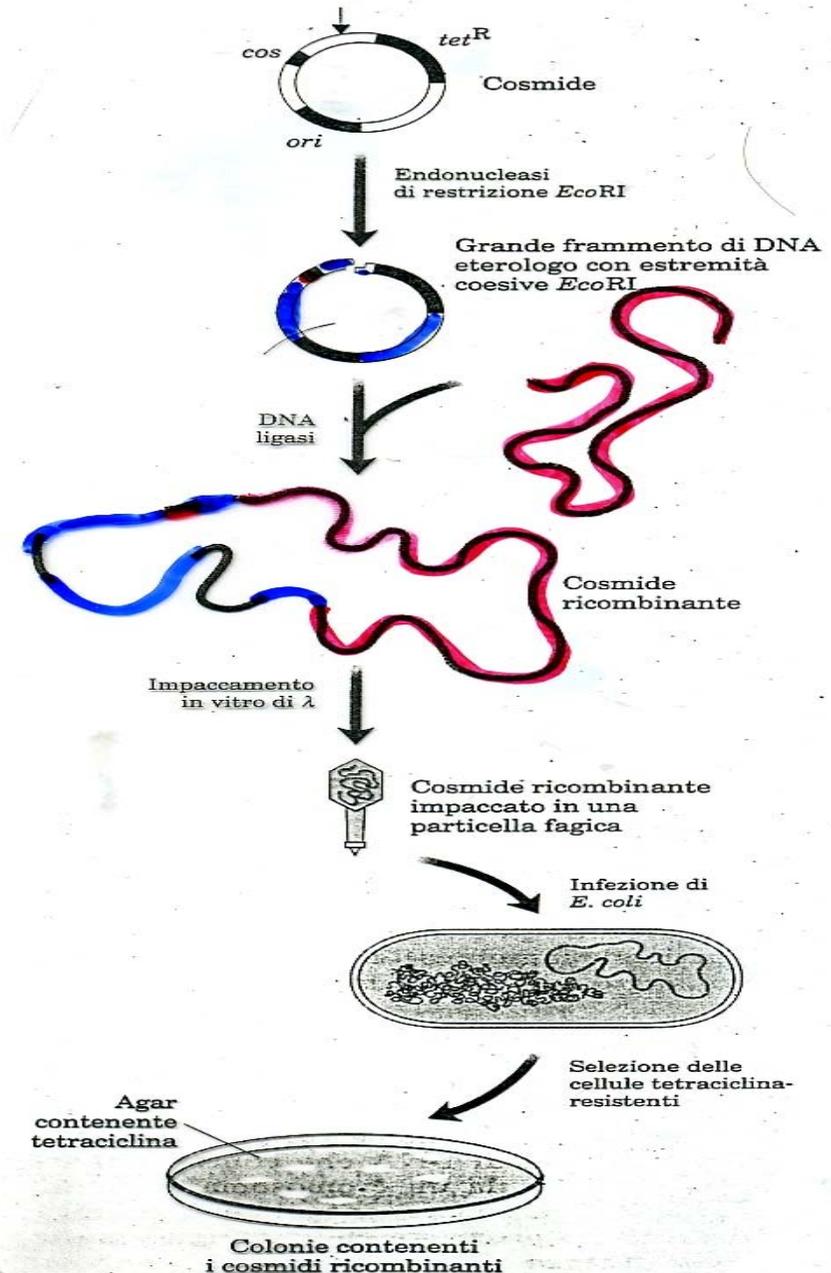


I COSMIDI

Sono **plasmidi ricombinanti** che uniscono caratteristiche utili dei plasmidi tradizionali e del batteriofago λ ,

permettono il clonaggio di frammenti di DNA più lunghi (fino a **45000** coppie di basi),

i cosmidi sono piccole molecole di DNA circolare, che hanno da 5000 a 7000 coppie di basi.

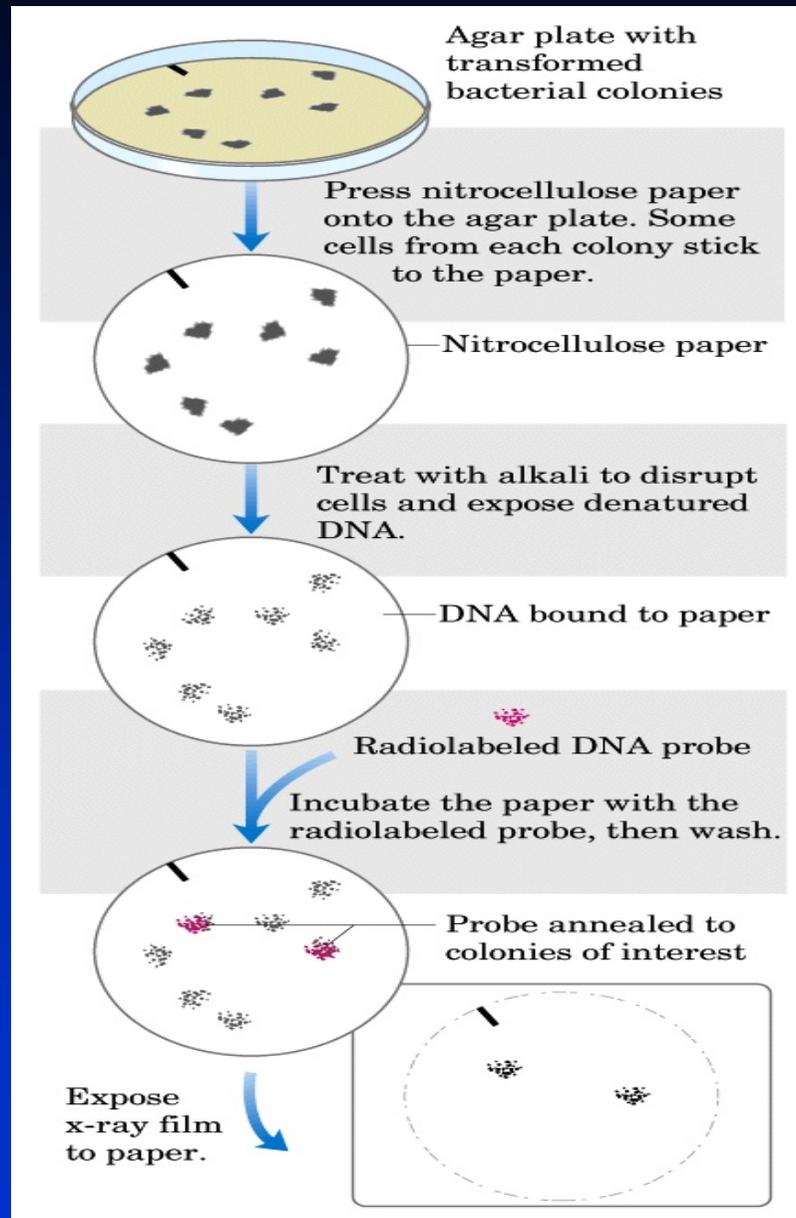


I COSMIDI

contengono:

- 1) un'origine della replicazione,
- 2) uno o più marcatori di selezione (es. elementi di resistenza agli antibiotici),
- 3) un numero variabile di siti di restrizione unici, per l'inserzione di DNA eterologo, all'interno dei marcatori di selezione,
- 4) un sito **cos**, che é una sequenza di DNA che nel batteriofago λ é necessaria per l'impaccamento.

Tipo di vettore	Metodo di introduzione in E.coli	Metodo di propagazione	Dimensione inserto
Plasmidi modificati mediante tecniche di DNA ricombinante	Trasformazione. Le cellule sono rese competenti per fare entrare il vettore, poi le cellule trasformate sono selezionate usando un marcatore di selezione	Replicazione del plasmide	Fino a 15'000 bp
Batteriofago λ	Impaccamento in vitro del vettore ricombinante nelle particelle fagiche, seguito da infezione	Replicazione del fago	Fino a 23'000 bp
Cosmidi, costruiti da plasmidi e da geni del DNA di λ	Trasformazione o infezione fagica (a seconda delle dimensioni del frammento di DNA inserito)	Replicazione di tipo plasmidico	Fino a 45'000 bp

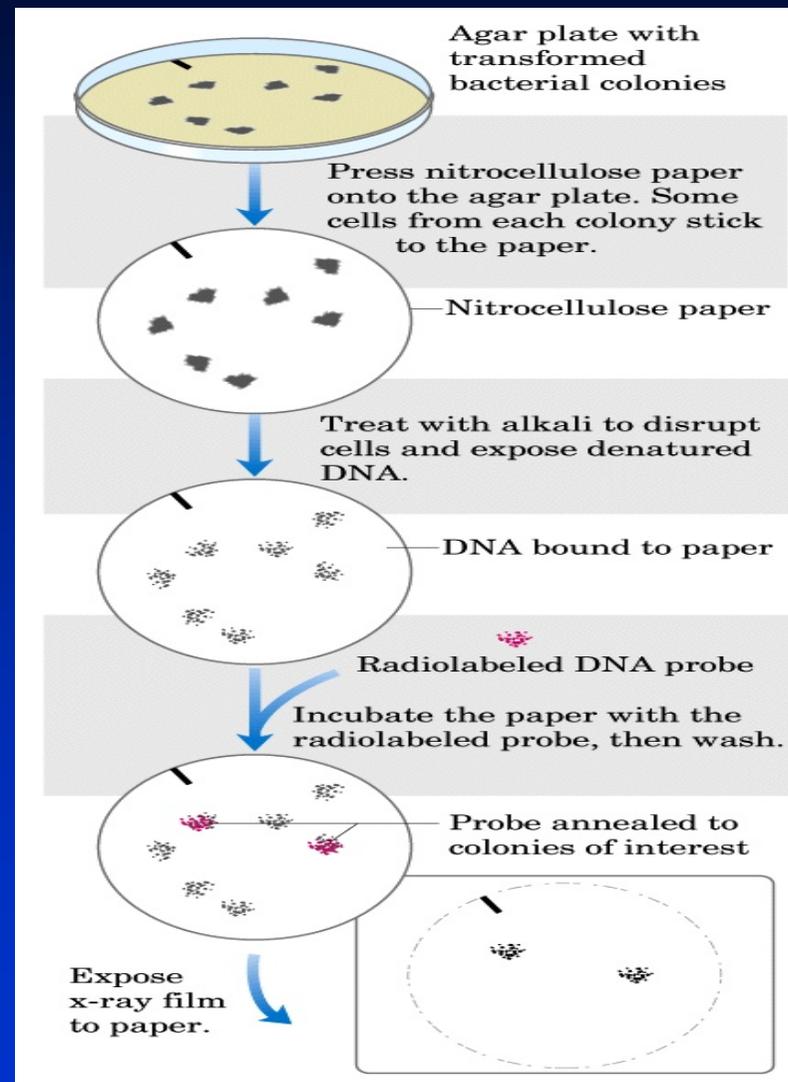


L'IBRIDAZIONE SU COLONIA

GLI ESPERIMENTI CONDOTTI SU COLONIE BATTERICHE

Quando si conducono esperimenti su colonie batteriche (ad es. su piastre di agar) **non** si lavora sulle **colonie originali**, che potranno essere usate come **fonte di DNA clonato** per ulteriori studi, ma su **copie identiche**;

per **colonia batterica** si intende l'insieme dei batteri che derivano da una cellula iniziale.



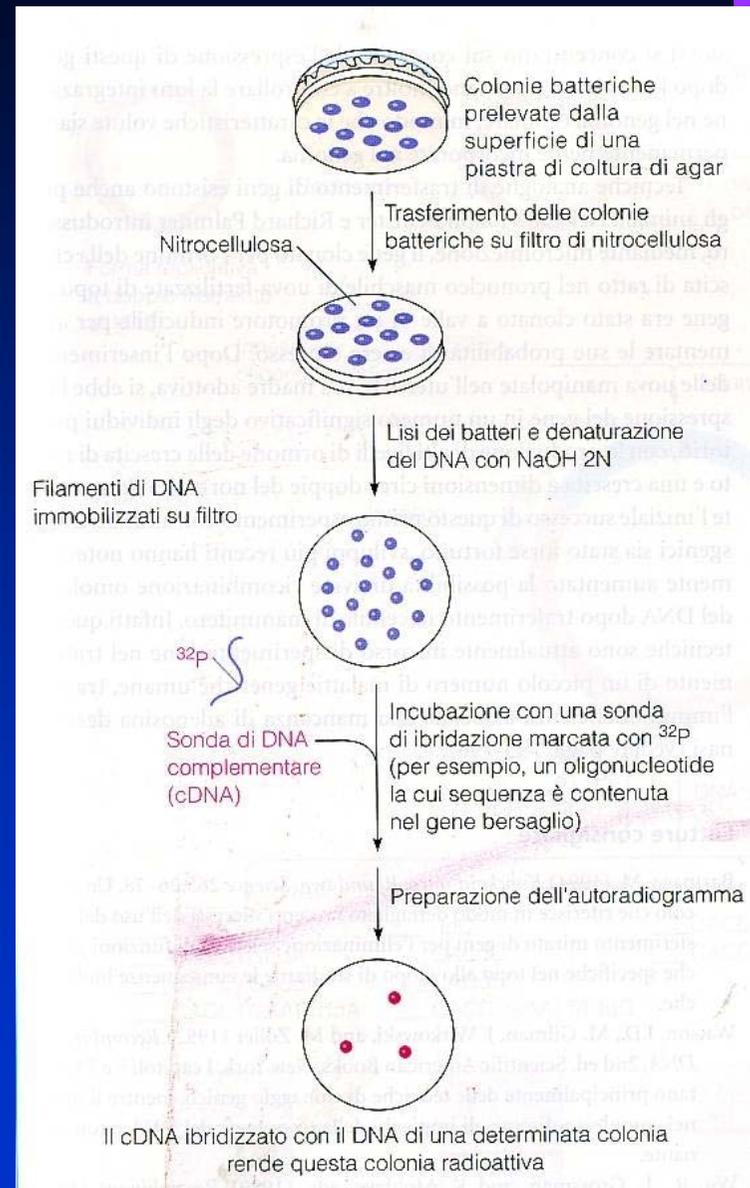
L'IBRIDAZIONE SU COLONIA

Con questa tecnica, si cerca la **sequenza di DNA** desiderata invece del prodotto del gene clonato,

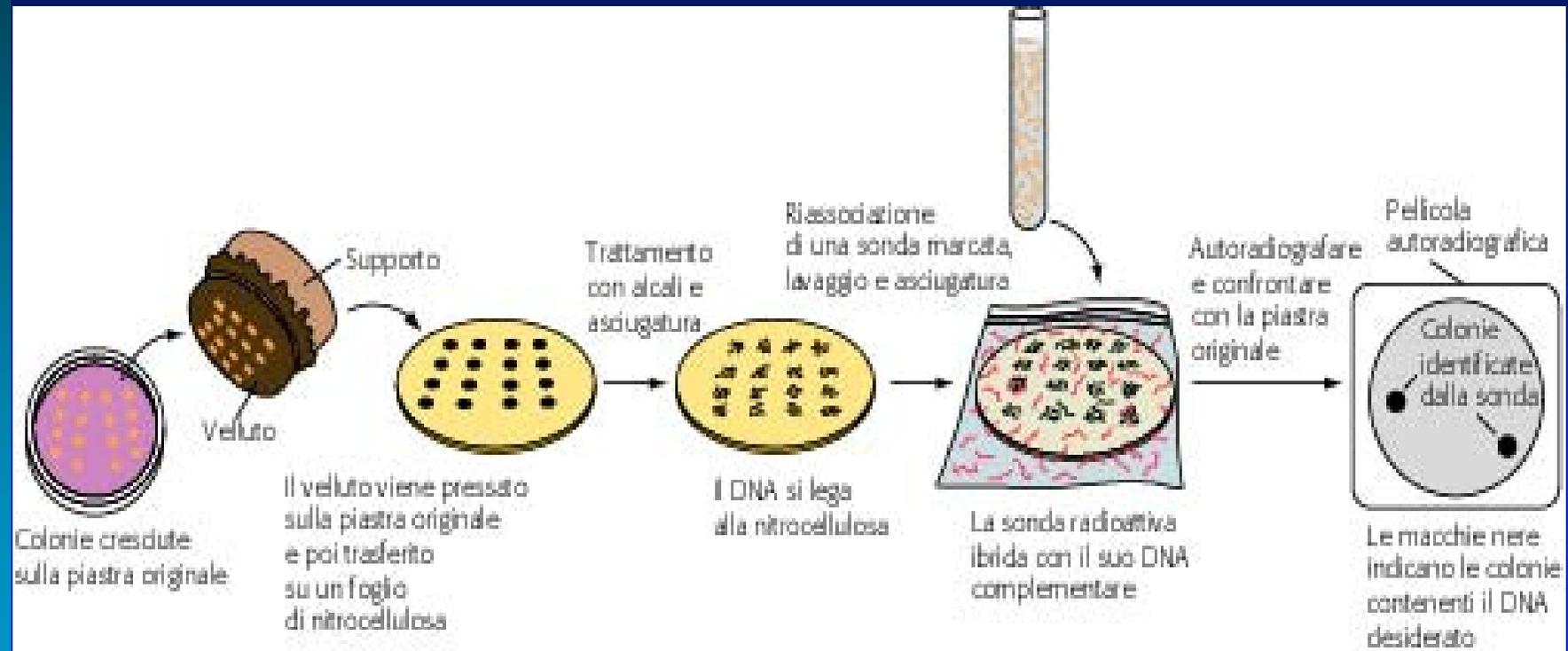
questo metodo é utilizzato quando **non si é** in grado di stabilire se il gene clonato sará **espresso**;

si usa una **sonda marcata** di un acido nucleico **omologo alla sequenza bersaglio** (quella cercata), per sondare le singole colonie batteriche riguardo la presenza di quella data sequenza;

per clonare un gene é spesso necessario costruire **una libreria genomica**.



L'IDENTIFICAZIONE DI UN CLONE CONTENENTE IL FRAMMENTO DI DNA DESIDERATO MEDIANTE IBRIDAZIONE



LA LIBRERIA GENOMICA

È una raccolta di frammenti di DNA del genoma di un particolare organismo, nella quale ogni frammento è legato a **un vettore di clonaggio**;

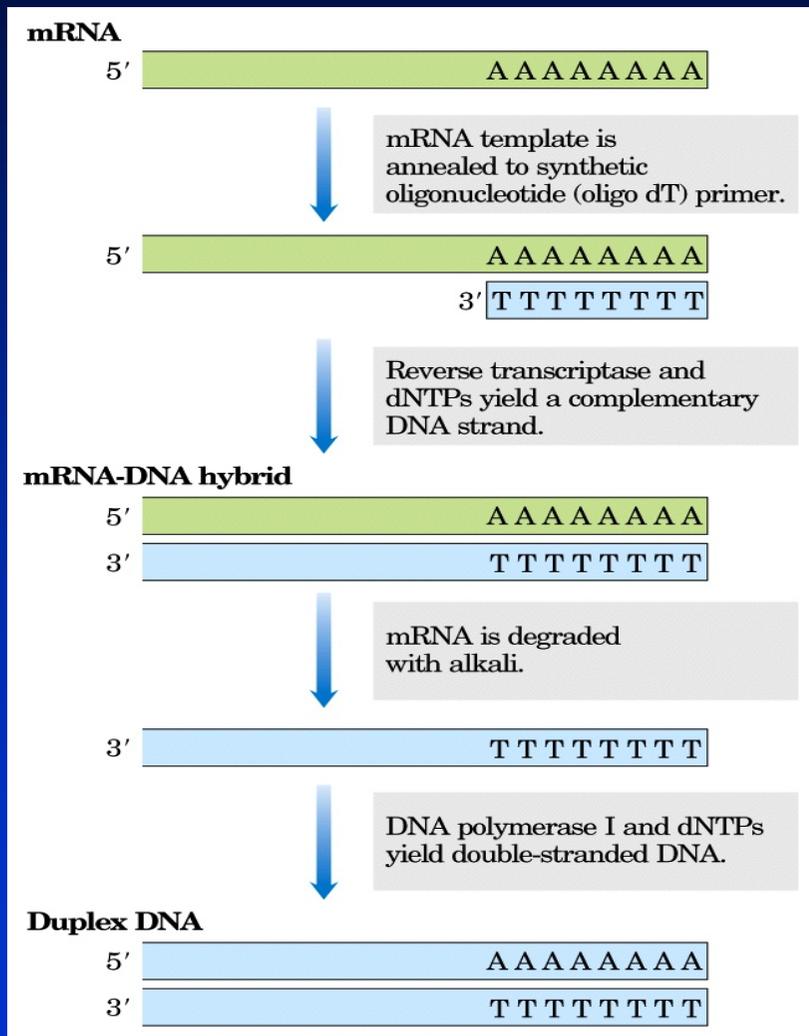
il DNA genomico è digerito in migliaia di frammenti, che vengono poi clonati. Il risultato è una vasta popolazione di batteri o batteriofagi, ciascuno dei quali contiene una molecola di **DNA ricombinante diversa**.

LA LIBRERIA GENOMICA DI cDNA

La libreria può comprendere solo i geni espressi, se si clonano solo copie di DNA complementare (cDNA) agli mRNA, in modo da ottenere una **libreria di cDNA**,

i cloni di una libreria, che contengono un gene specifico, sono identificati tramite l'**ibridazione con una sonda radioattiva**, contenente la sequenza del nucleotide complementare.

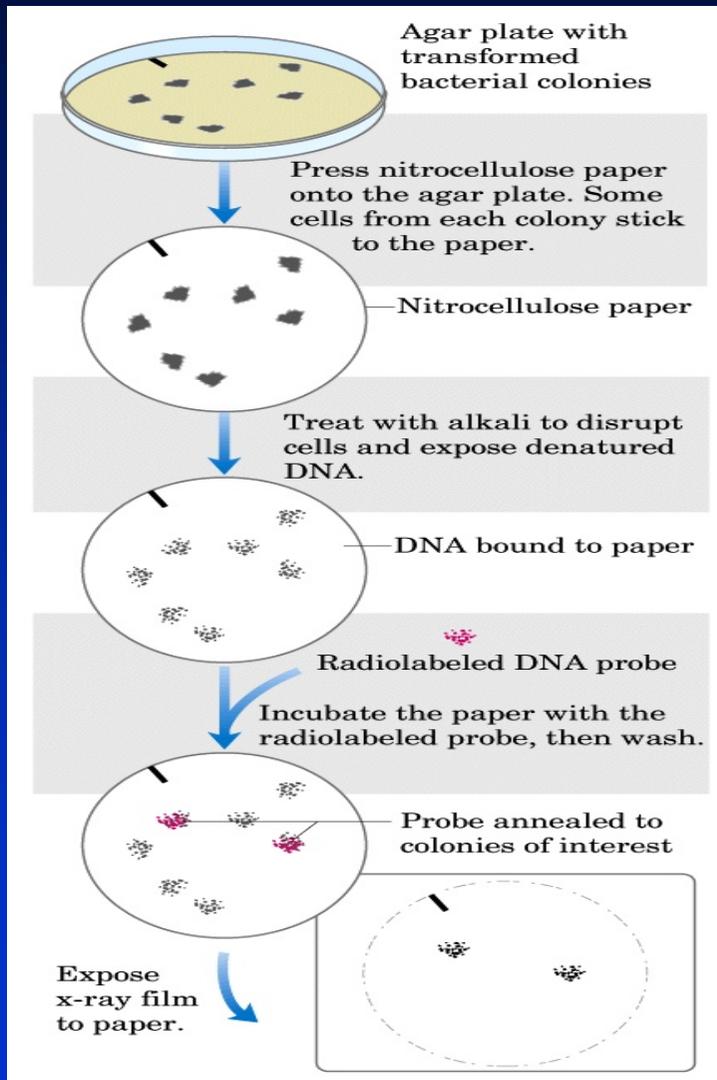
LA COSTRUZIONE DI UNA LIBRERIA DI cDNA A PARTIRE DALL'mRNA



L'**mRNA** di una cellula conterrà i trascritti di migliaia di geni ed i **cDNA** prodotti (tramite la trascrittasi inversa) saranno **eterogenei**,

ogni DNA a doppia elica, prodotto con questo metodo, viene inserito in un appropriato vettore di clonazione.

LO SCREENING MEDIANTE IBRIDAZIONE



La sonda di **DNA radioattivo** ibrida soltanto con il **DNA omologo**. La sonda ibridata viene evidenziata con l'autoradiografia;

dopo l'identificazione delle colonie marcate, le corrispondenti colonie sulla piastra di agar originale possono essere usate come **fonte di DNA clonato** per ulteriori studi.

LA CLONAZIONE E L'ESPRESSIONE IN E.COLI DEL DNA DI MAMMIFERO

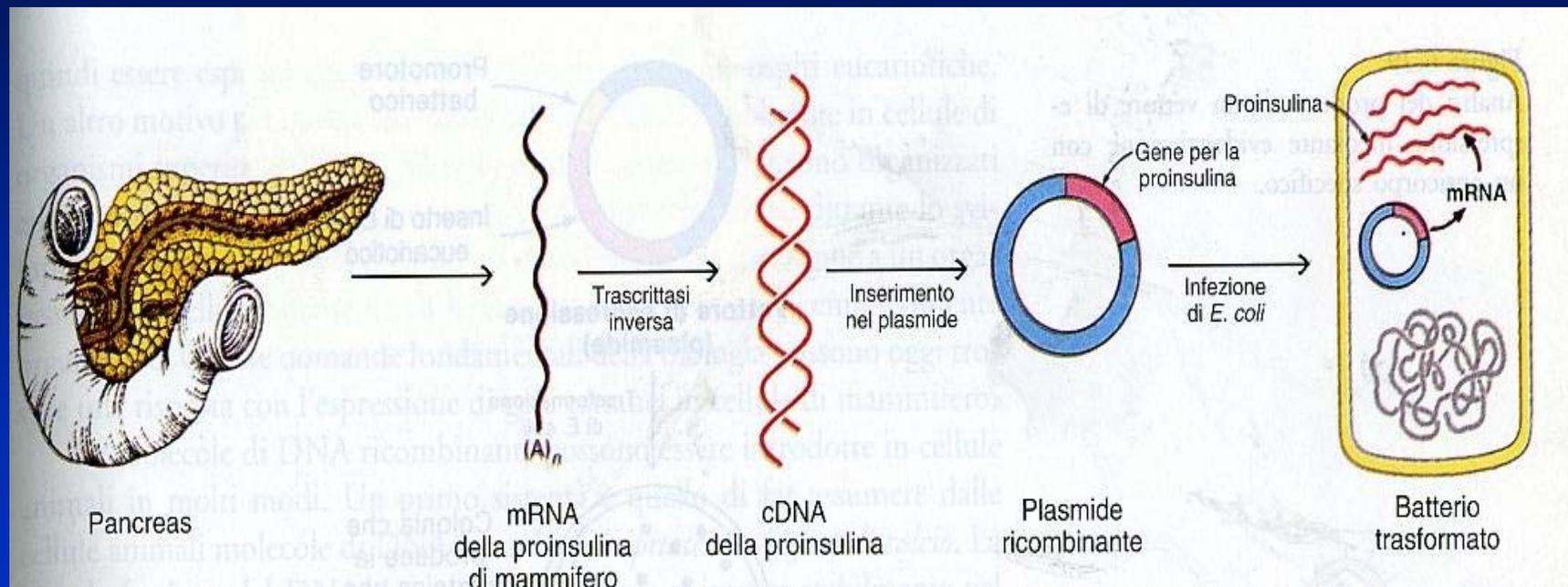
CLONAZIONE ED ESPRESSIONE IN E.COLI DEL DNA DI MAMMIFERO

I geni degli eucarioti sono **discontinui** e non possono essere espressi dai batteri che mancano degli enzimi rimuoventi gli introni dal trascritto primario,

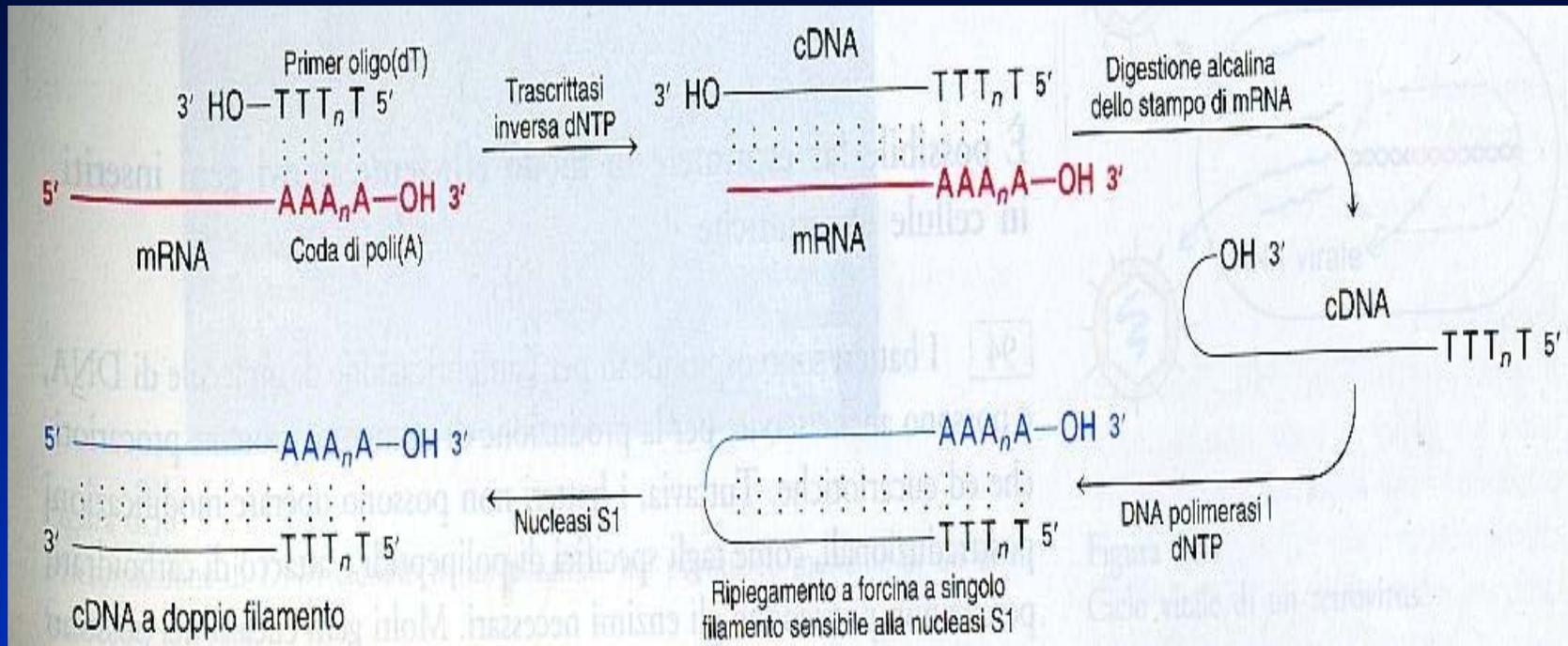
l'ostacolo é superato introducendo nei batteri un **DNA ricombinante** complementare all'mRNA maturo, cioè privo di introni;

la chiave per ottenere il **cDNA** è l'enzima **trascrittasi inversa**.

UN ESEMPIO È LA SINTESI DELLA PROINSULINA, UN PRECURSORE DELL'INSULINA, MEDIANTE CLONI DI E. COLI TRASFORMATI.



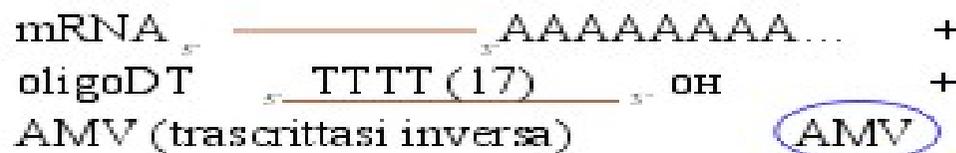
L'AZIONE DELLA TRASCRIPTASI INVERSA



La trascrittasi inversa sintetizza il **cDNA** da uno stampo di RNA; essa **necessita** di un primer (oligo-dT) e di 4 deossiribonucleosidi trifosfato.

L'AZIONE DELLA TRASCRITTASI INVERSA

e procede come segue:



I fase:



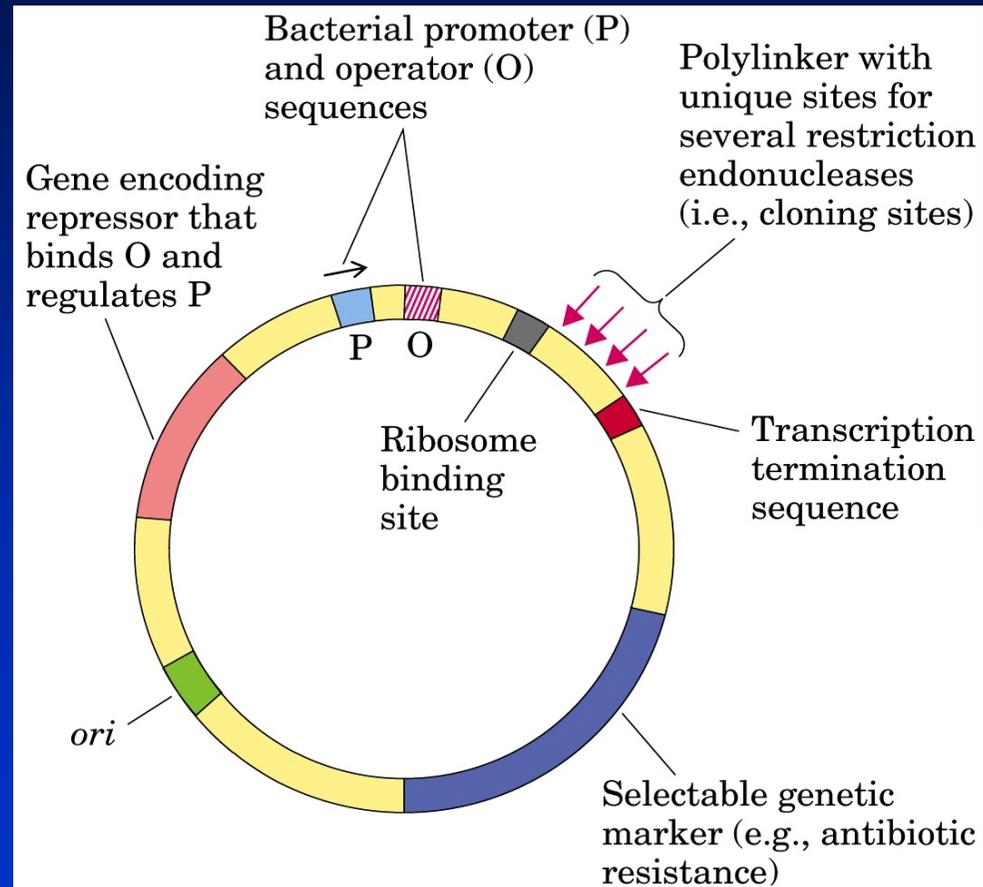
II fase:



III fase:



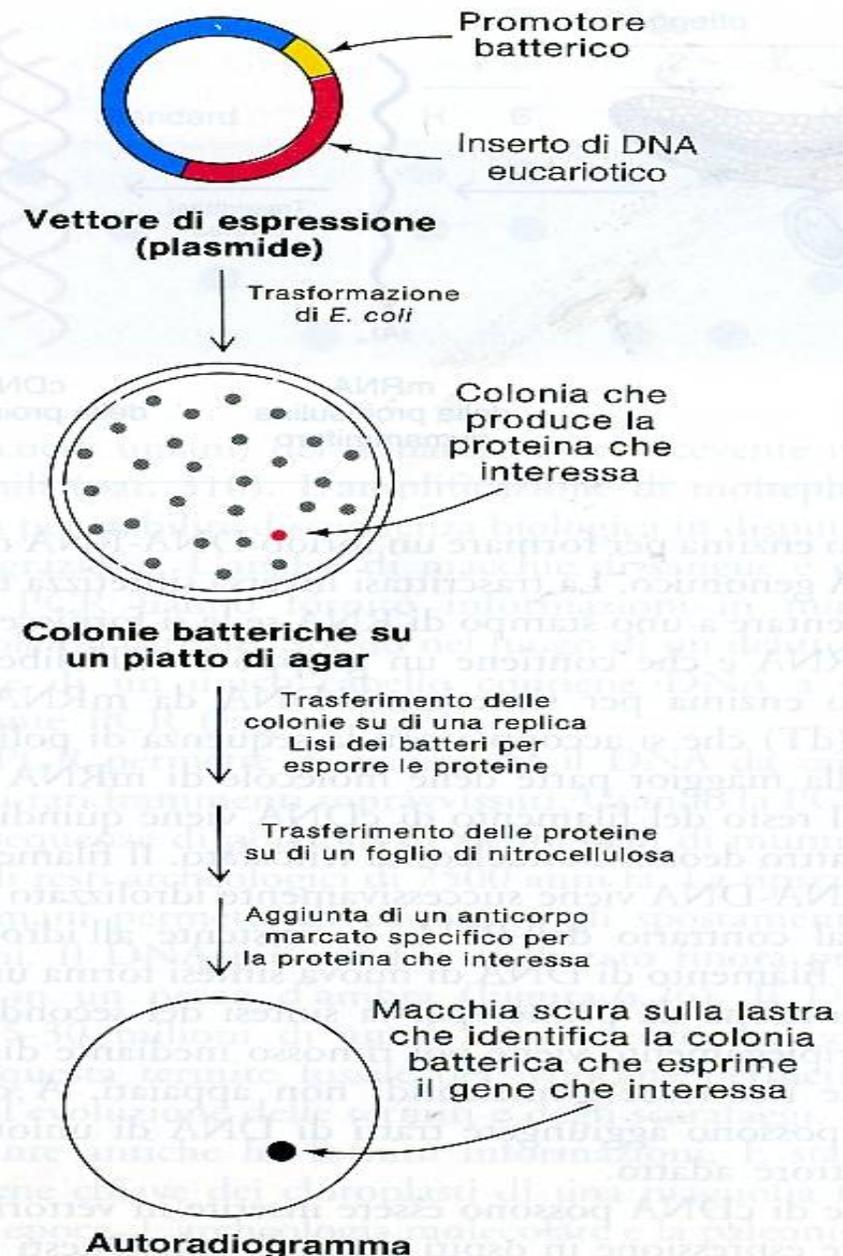
IL cDNA VIENE INSERITO VICINO AD UN POTENTE PROMOTORE BATTERICO E VIENE ESPRESSO IN OSPITI COME L'E.COLI



CLONAZIONE ED ESPRESSIONE IN E.COLI DEL DNA DI MAMMIFERO

I cloni di **cDNA** possono essere selezionati identificando la colonia che sintetizza la proinsulina;

questo metodo é usato tutte le volte che una proteina viene espressa e si dispone del suo A.C.



I PRODOTTI DEL DNA RICOMBINANTE IN MEDICINA

table 29-3

Some Recombinant DNA Products in Medicine

Product category	Examples/uses
Anticoagulants	Tissue plasminogen activator (TPA) activates plasmin, an enzyme involved in dissolving clots; effective in treating heart attack victims.
Blood factors	Factor VIII promotes clotting and is deficient in hemophiliacs; use of factor VIII produced by recombinant DNA technology eliminates infection risks associated with blood transfusions.
Colony stimulating factors	Immune system growth factors that stimulate leukocyte production; used to treat immune deficiencies and to fight infections.
Erythropoietin	Stimulates erythrocyte production; used to treat anemia in patients with kidney disease.
Growth factors	Stimulate differentiation and growth of various cell types; used to promote wound healing.
Human growth hormone	Used to treat dwarfism.
Human insulin	Used to treat diabetes.
Interferons	Interfere with viral reproduction; used to treat some cancers.
Interleukins	Activate and stimulate different classes of leukocytes; possible uses in treating wounds, HIV infection, cancer, and immune deficiencies.
Monoclonal antibodies	Extraordinary binding specificity is used in: diagnostic tests; targeted transport (of drugs, toxins, or radioactive compounds to tumors as a cancer therapy); many other applications.
Superoxide dismutase	Prevents tissue damage from reactive oxygen species when tissues briefly deprived of O ₂ during surgery suddenly have blood flow restored.
Vaccines	Proteins derived from viral coats are as effective in "priming" an immune system as the killed virus more traditionally used for vaccines, but are safer; first developed was the vaccine for hepatitis B.

L'INSERZIONE E L'ESPRESSIONE IN CELLULE OSPITI EUCARIOTICHE DI GENI EUCARIOTICI

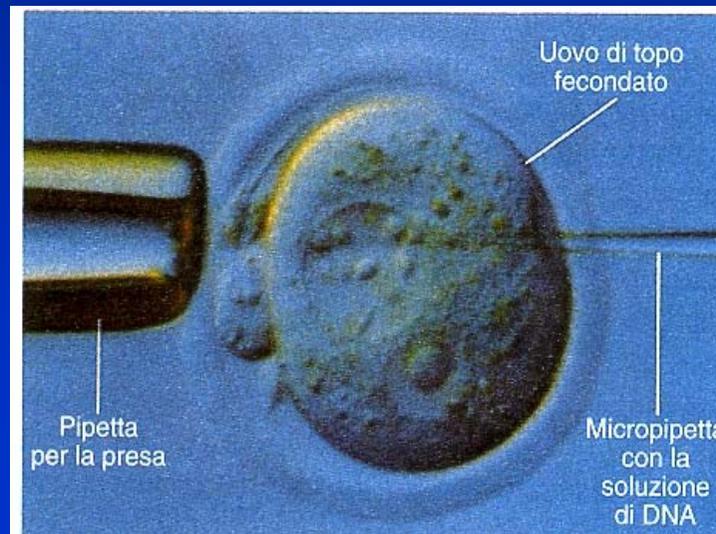
L'INSERZIONE E L'ESPRESSIONE IN CELLULE OSPITI EUCARIOTICHE DI GENI EUCARIOTICI

Molti geni eucariotici possono essere **inseriti ed espressi** in cellule eucariotiche, dove sono possibili modificazioni post-traduzionali,

così si può **studiare** l'organizzazione e l'espressione dei geni negli eucarioti.

LE MOLECOLE DI DNA RICOMBINANTE POSSONO ESSERE INTRODOTTE IN CELLULE ANIMALI O VEGETALI ATTRAVERSO:

- 1) la loro precipitazione con **fosfato di calcio**; esse si integrano stabilmente nel DNA cromosomiale, ma l'efficienza é bassa, forse entrano per endocitosi,
- 2) la **microiniezione del DNA** nel nucleo con una micropipetta. Es.: circa il 2% delle cellule di topo iniettate é vitale e contiene il nuovo gene.



LE MOLECOLE DI DNA RICOMBINANTE POSSONO ESSERE INTRODOTTE IN CELLULE ANIMALI O VEGETALI ATTRAVERSO:

- 3) **vettori retrovirali** la cui forma a doppia elica, prodotta dalla trascrittasi inversa, si incorpora a caso nel genoma della cellula ospite eucariotica,
 - 4) **alcuni parassiti batterici,**
 - 5) **l'elettroporesi,**
- ecc.*

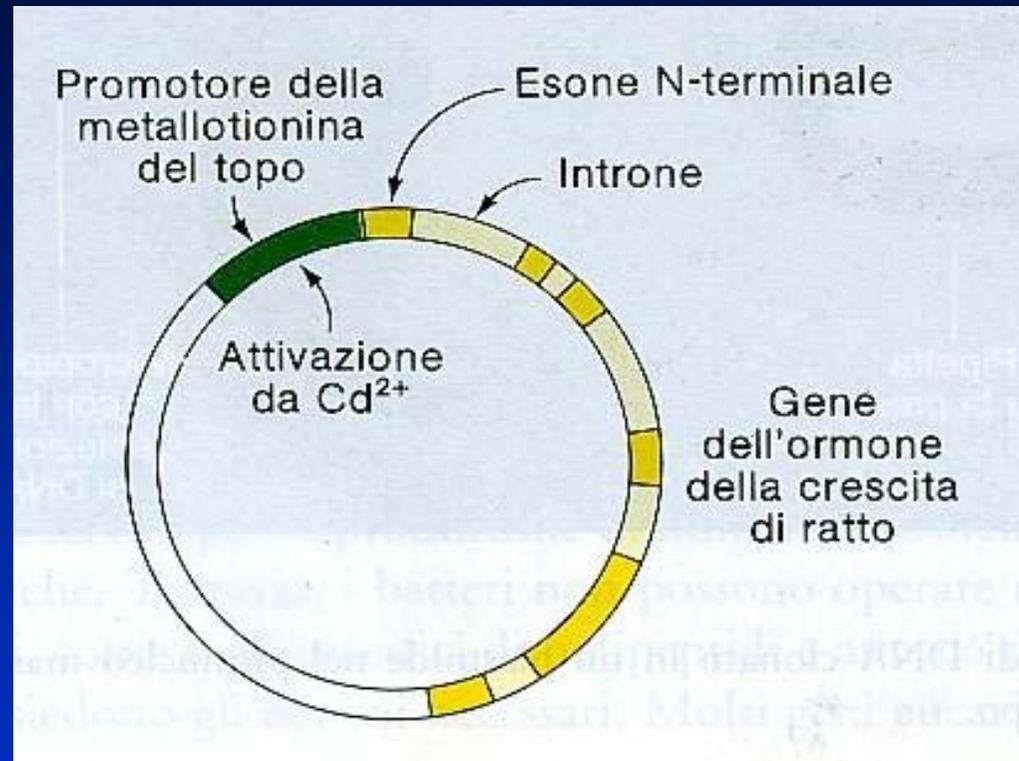
L'INSERZIONE ed ESPRESSIONE DI GENI EUCARIOTICI MEDIANTE MICROINIEZIONE DEL DNA



I topi giganti, ottenuti per mezzo dell'ingegneria genetica, sono un esempio di geni estranei espressi in cellule di mammifero.



UN GENE ESTRANEO, SOTTO IL CONTROLLO DI UN NUOVO PROMOTORE, PUÒ ESSERE INTEGRATO ED ESPRESSO EFFICACEMENTE IN CELLULE DI MAMMIFERO



In questo esperimento, il nuovo promotore della **somatotropina** (ormone della crescita) è il promotore inducibile della **metallothionina** del topo (attivato da **Cd^{2+}** inseriti nella dieta dei topi appena partoriti);

la **metallothionina** è una proteina che lega **Cd^{2+}** , i quali stimolano la sua sintesi.

L'ESPERIMENTO CONSISTE:

- a) nel clonare il gene per l'ormone della crescita di ratto in un plasmide, a valle di un promotore inducibile, per aumentare le sue possibilità di essere espresso,
- b) nell'introduzione, mediante microiniezione, del gene nel pronucleo maschile di uova fertilizzate di topo,
- c) nell'inserire le uova manipolate nell'utero di una madre adottiva.



LA CREAZIONE DI TOPI TRANSGENICI

Il gene clonato verrà **espresso** in un numero significativo di topi partoriti, che avranno dimensioni doppie rispetto il normale,

questi **topi transgenici**, giganti, contengono copie multiple (~30 per cellula) del gene della **somatotropina**, che verrà espresso somministrando loro una dieta ricca di **Cd²⁺** (essendo il **nuovo promotore** della somatotropina quello della **metalloionina**).



IL CLONAGGIO NELLE CELLULE VEGETALI ATTRAVERSO UN PARASSITA BATTERICO

L'introduzione di DNA ricombinante nelle piante è di grandissima importanza nell'agricoltura;

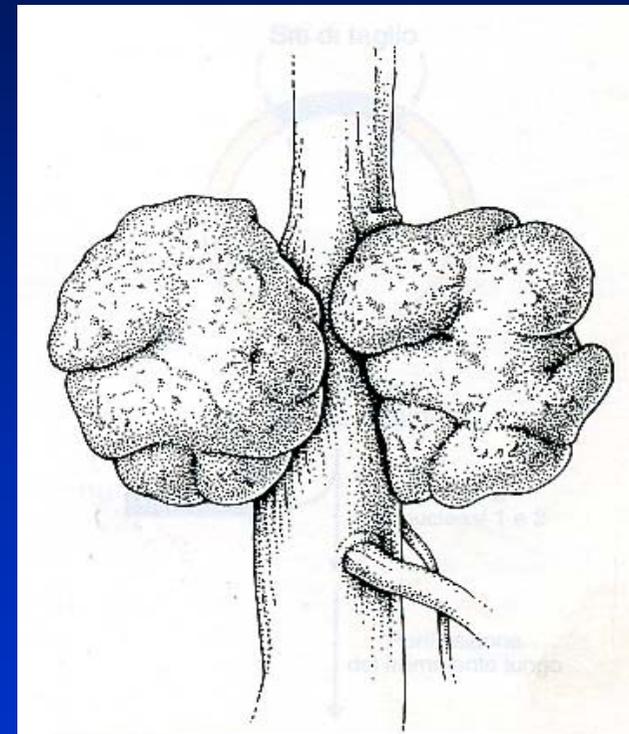
permette ad es. **di produrre** raccolti a più alto contenuto nutrizionale e più abbondanti, resistenti a condizioni ambientali avverse, come infestazioni da insetti, malattie, freddo, siccità.

L'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

La natura offre un eccellente veicolo per introdurre nuovi geni nelle piante:

Agrobacterium tumefaciens;

A. tumefaciens entra nelle piante tramite una ferita e le induce a produrre il tumore così detto a "**cresta di gallo**".

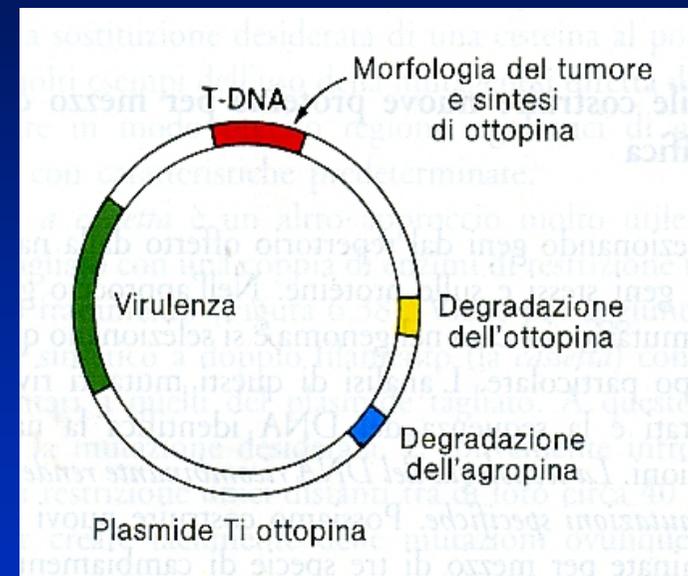


IL CLONAGGIO NELLE CELLULE VEGETALI ATTRAVERSO L'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

I geni patogeni sono in un voluminoso plasmide (**plasmide Ti**) del batterio,

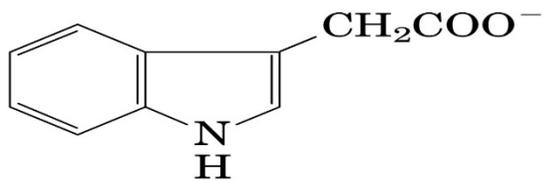
quando esso è a contatto con una cellula vegetale, un segmento del plasmide (**T-DNA, ~25000 coppie di basi**) si integra in posizione casuale in un cromosoma della cellula vegetale;

questo è un raro esempio di trasferimento di DNA da un procariota ad un eucariota: è **un processo naturale di ingegneria genetica**.



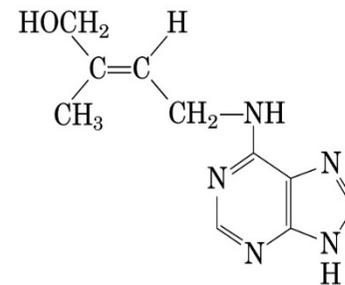
I METABOLITI PRODOTTI DALLE CELLULE INFETTATE DALL'AGROBACTERIUM

Auxins

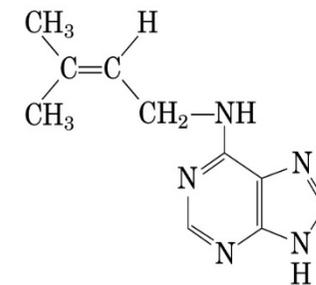


Indoleacetate

Cytokinins

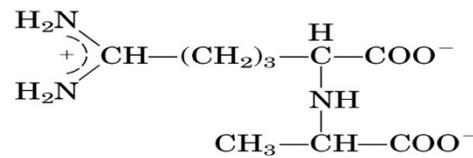


Zeatin

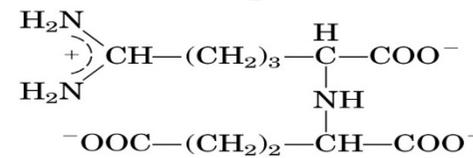


Isopentenyl adenine
(i⁶ Ade)

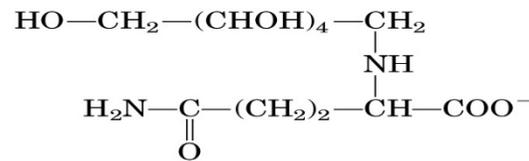
Opines



Octopine



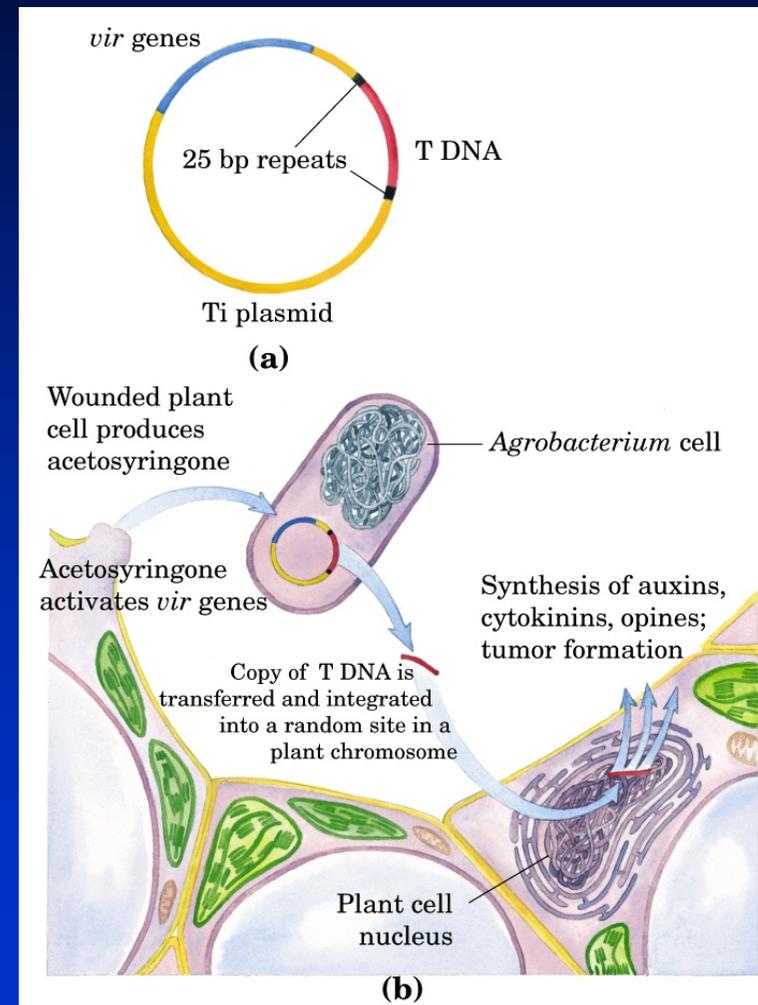
Nopaline



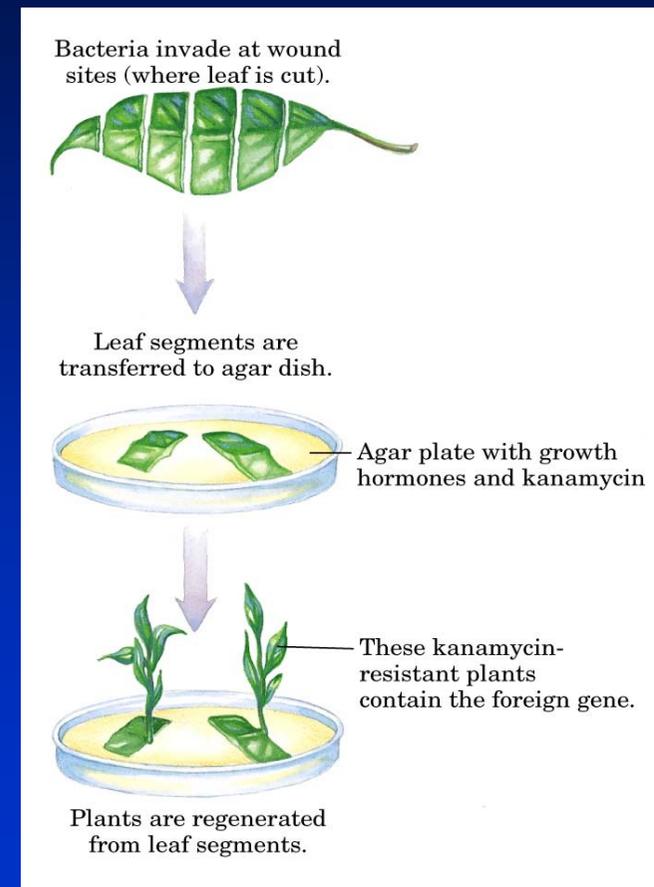
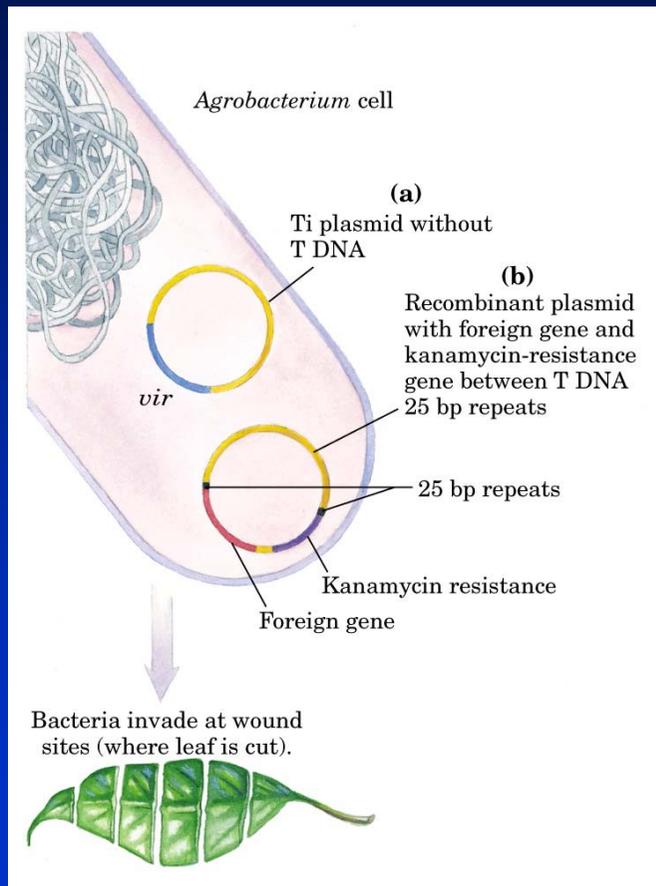
Mannopine

IL CLONAGGIO NELLE CELLULE VEGETALI ATTRAVERSO L'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Geni estranei (utili) possono così essere introdotti nella regione **T-Dna** del plasmide, con tecniche di DNA ricombinante e l'infezione con **A. tumefaciens** modificato può trasferire questi nuovi geni alle piante.

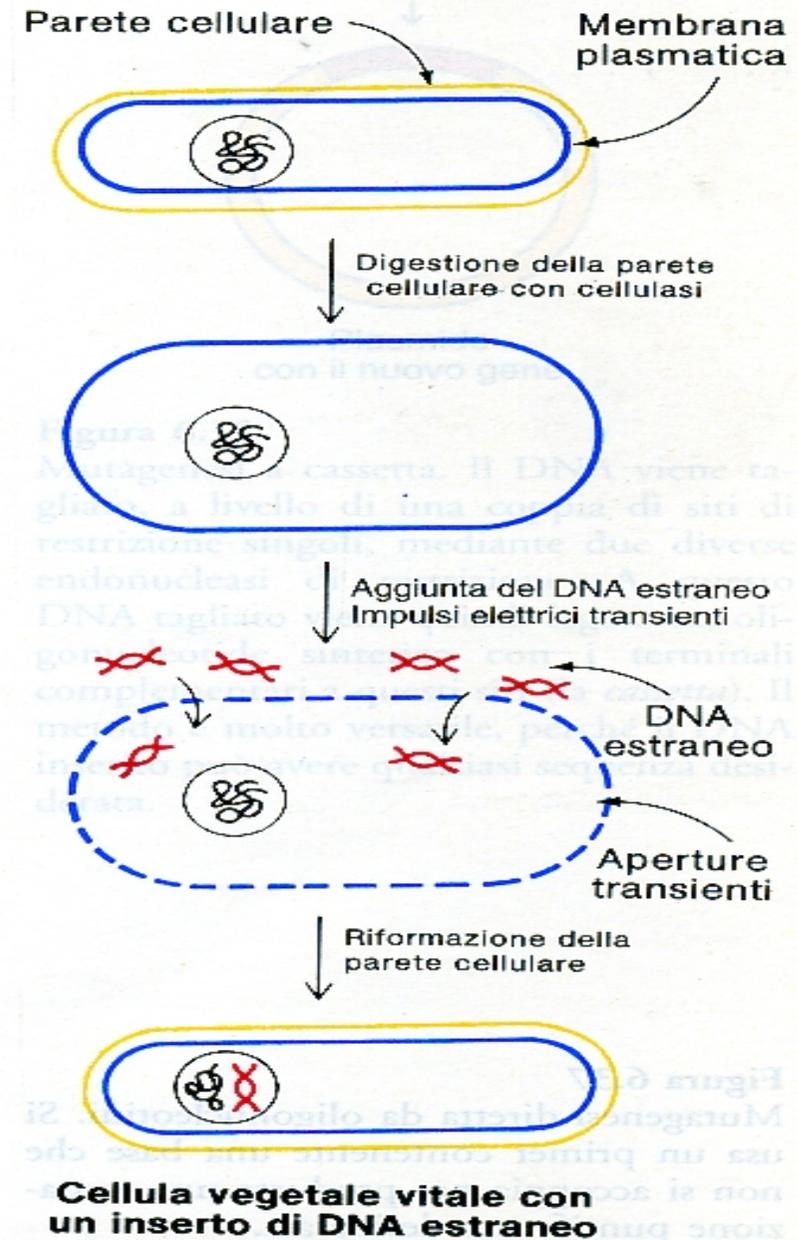


LA STRATEGIA A DUE PLASMIDI PER OTTENERE UNA PIANTA RICOMBINANTE



L'ELETTROPORESI

DNA estraneo può essere introdotto in cellule vegetali, applicando un intenso campo elettrico, utilizzando una tecnica chiamata **elettroporesi**.



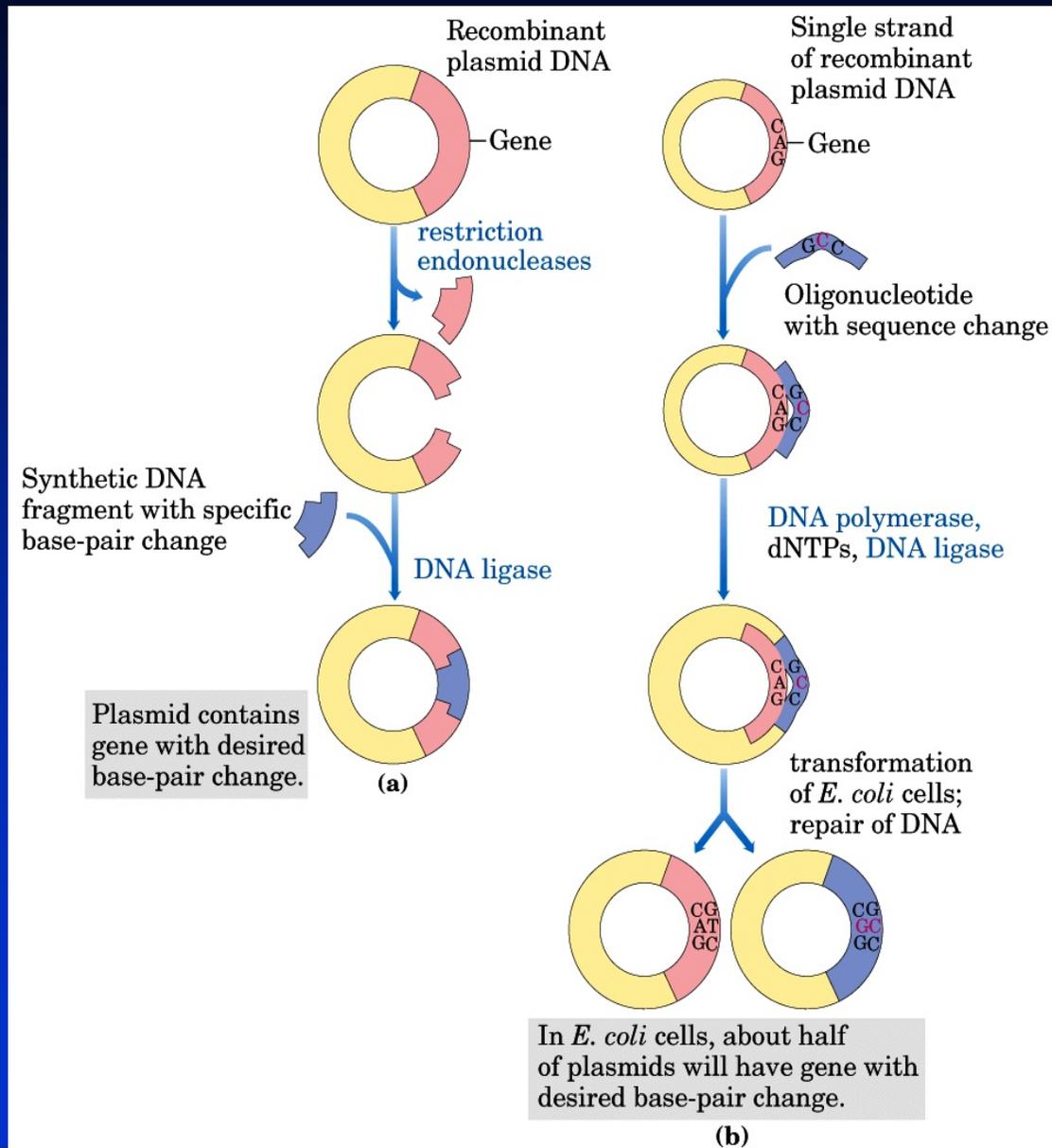
LA MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

La struttura di una proteina può essere modificata alterando la sequenza del DNA del gene che la codifica;

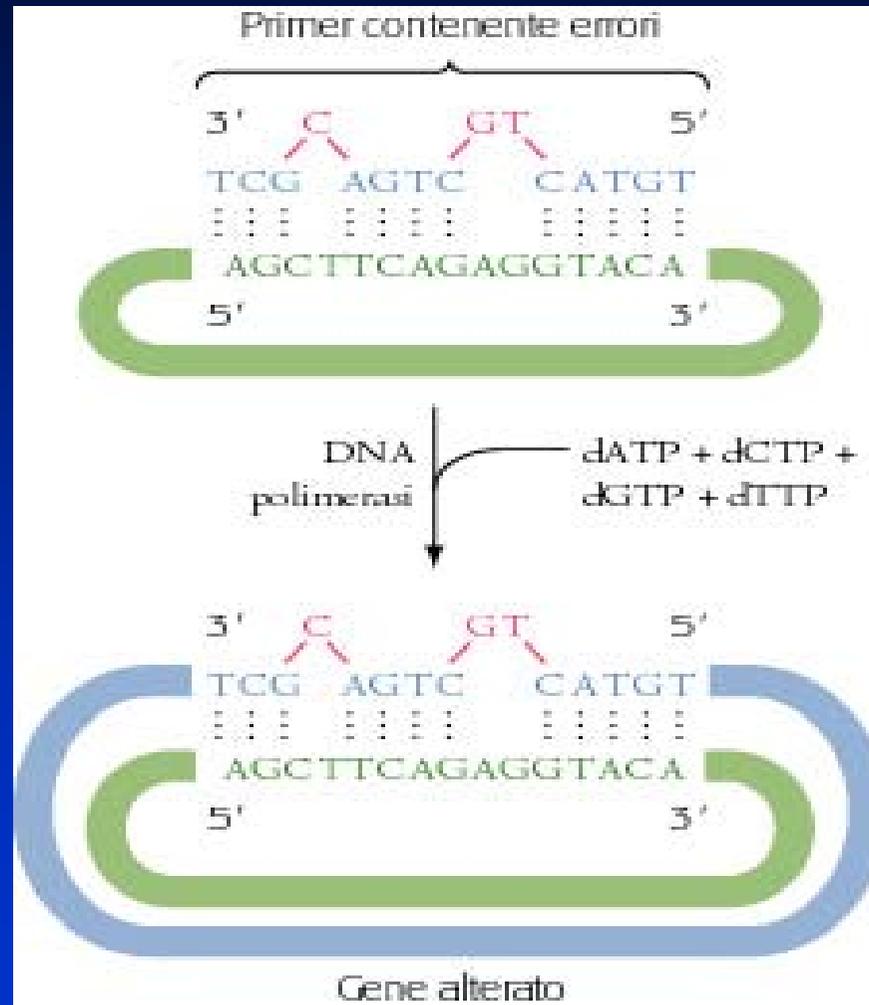
uno o più aminoacidi possono essere modificati nei 2 modi seguenti:

1. se la sequenza da modificare è delimitata da siti di restrizione, la variazione si ottiene sostituendo quel segmento di DNA con uno **sintetico**, contenente la mutazione desiderata,
2. se nella sequenza sono assenti siti di restrizione, si utilizza la tecnica chiamata **mutagenesi diretta da un oligonucleotide**, per creare una specifica mutazione nella sequenza.

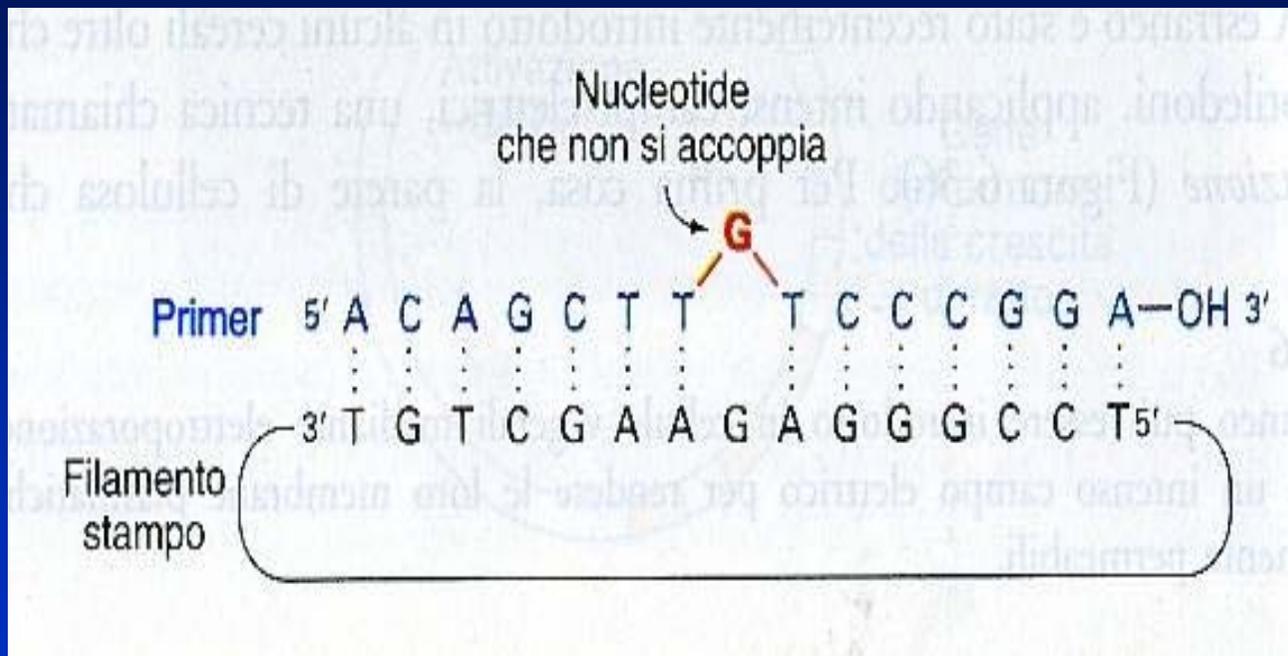
LE DUE STRATEGIE PER OTTENERE UNA MUTAZIONE SITO-SPECIFICA



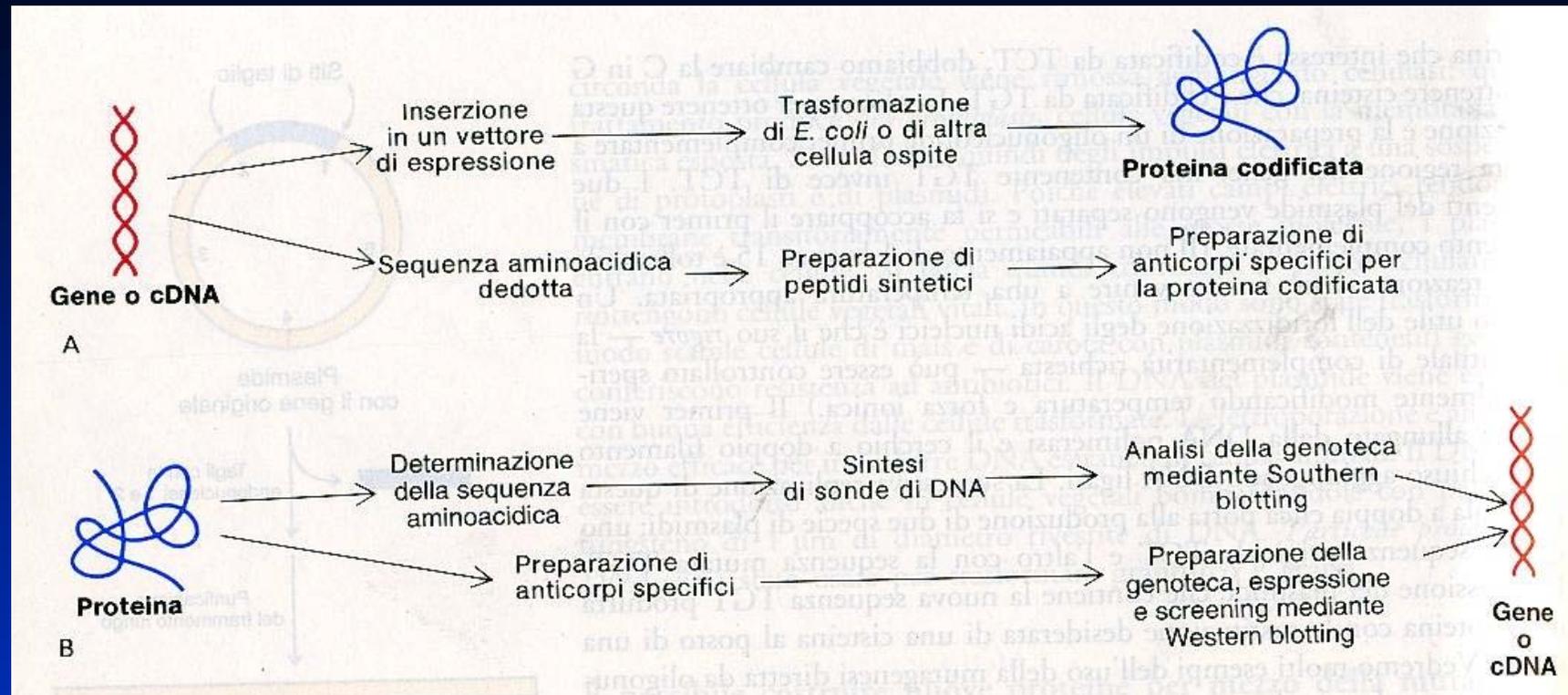
LA MUTAGENESI SITO SPECIFICA



LA FORMAZIONE DELLA MUTAZIONE PUNTIFORME DESIDERATA



LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE HA APERTO NUOVI ORIZZONTI



SOUTHERN BLOTTING

Tecnica che permette di identificare un frammento di restrizione contenente una sequenza di basi azotate specifica, ibridizzandolo con un filamento marcato di DNA complementare.

WESTERN BLOTTING

Tecnica che permette di identificare una particolare proteina, colorandola con un anticorpo specifico.

LA PCR

La PCR



La PCR (Polimerase Chain Reaction: reazione di polimerizzazione a catena) è una tecnica di amplificazione in vitro, che consente la sintesi esponenziale di un frammento di DNA, a partire da uno stampo, del quale si conosca la sequenza nucleotidica delle regioni terminali;

fu introdotta da Kary Mullis alla metà degli anni '80 e ha rivoluzionato la genetica molecolare.

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI PER EFFETTUARE UNA PCR:

il DNA stampo,

la Taq polimerasi,

i primers,

i deossiribonucleosidi 5' trifosfato (dNTPs),

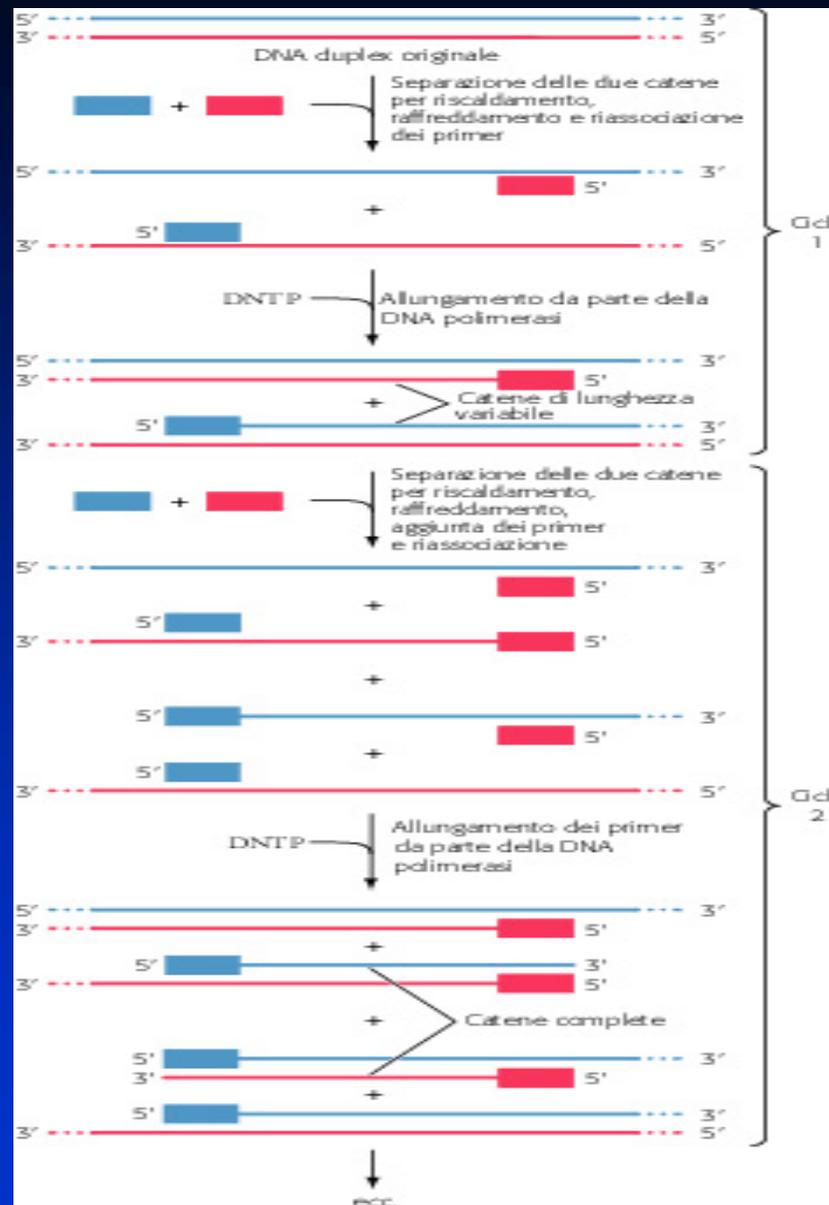
un termocicizzatore,

gli strumenti per l'estrazione, l'allestimento e l'esecuzione
dell'amplificazione.

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI PER EFFETTUARE UNA PCR

- 1) il DNA deve contenere la **sequenza da amplificare** (meno di 1 μg di DNA genomico totale; a volte basta una singola molecola di DNA),
- 2) la **TAQ Polimerasi** è una DNA polimerasi estratta dal batterio *Thermophilus Aquaticus*. Il suo vantaggio è nella termostabilità. Sintetizza il DNA in direzione 5'→3'. Ha attività 5'-3' esonucleasica. È priva di attività 3'-5' esonucleasica,
- 3) due sonde oligonucleotidiche (**primers**) complementari all'estremità 3' del segmento di DNA da amplificare, sintetizzati chimicamente,
- 4) una miscela dei quattro **nucleotidi precursori** (dNTPs: 2'deossiribonucleosidi 5' trifosfato).

IL PRINCIPIO DELLA PCR



IL PRINCIPIO DELLA PCR

Ogni ciclo è caratterizzato dallo svolgimento di tre processi:

1) denaturazione dello stampo al calore (95°C),

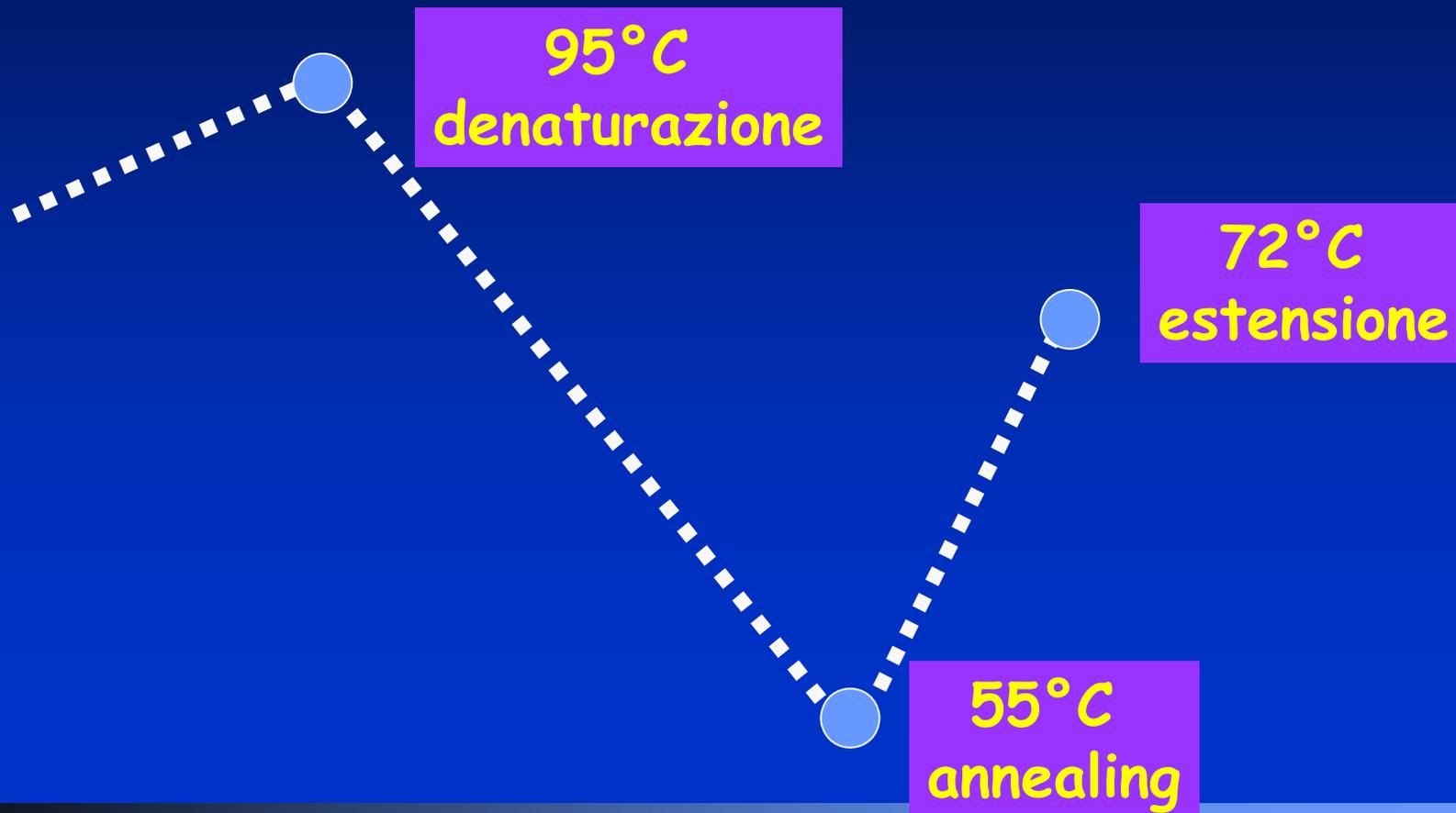
2) ibridazione dei primers (a circa 55°C),

la loro sequenza è complementare a quella delle estremità delle regioni di DNA bersaglio da amplificare,

3) polimerizzazione del filamento complementare (a 72°C),

i primers servono da innesco e si utilizzano i 4 dNTPs.

IL PRINCIPIO DELLA PCR



I TRE PASSAGGI DI OGNI CICLO DI PCR

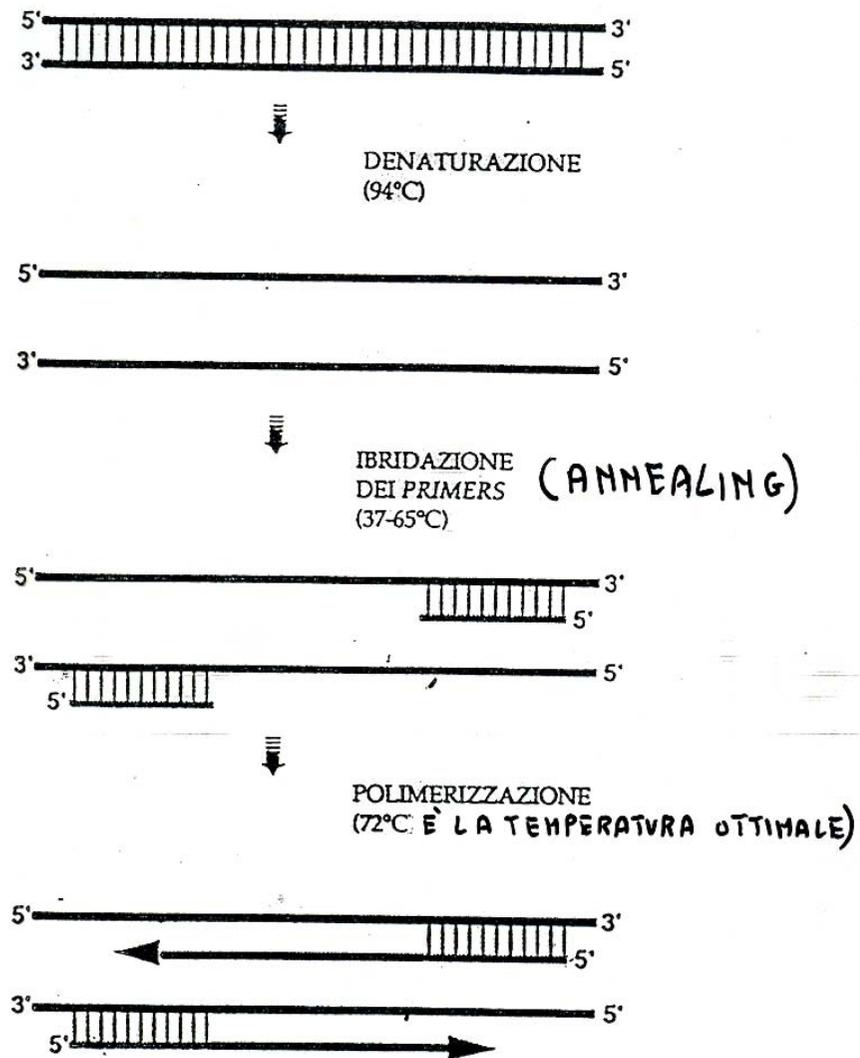


Fig. 1. Rappresentazione schematica dei tre passaggi di ogni ciclo di PCR. Il DNA del campione è rappresentato da una linea lunga nera; i primers da una corta linea grigia; il DNA neosintetizzato da una linea grigia con la freccia all'estremità 3' terminale.

LA PCR

Il ciclo di denaturazione-ibridazione é ripetuto per 30-40 volte per consentire la **sintesi esponenziale** del DNA localizzato tra i due primers;

al termine di **n** cicli, la miscela di reazione conterrà un numero massimo teorico di molecole di DNA pari a **2^n** .

I VANTAGGI NELL'USO DELLA Taq POLIMERASI

È sufficiente aggiungerlo una **sola volta** all'inizio della reazione,

la polimerizzazione ad alte temperature (70-75°C), con questo enzima, **aumenta la specificità**, perché riduce gli appaiamenti aspecifici degli oligonucleotidi e la formazione casuale di strutture secondarie;

é possibile **automatizzare** il processo.

I PRIMERS

Essi hanno una percentuale di **G+C** compresa tra il 40% e il 60%,
la sequenza deve essere **priva** di omologie interne,
si ottengono mediante **sintesi chimica**.

LA SENSIBILITÀ DELLA PCR

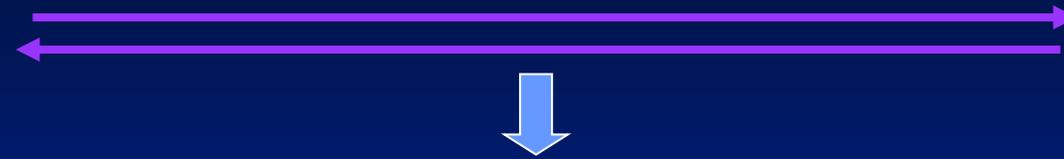
La PCR permette di ottenere in tempi brevi (**alcune ore**) alcuni μg di DNA, a partire da un numero molto ridotto di molecole iniziali, in casi estremi anche una singola molecola,

questo è legato alla **natura esponenziale** della reazione;

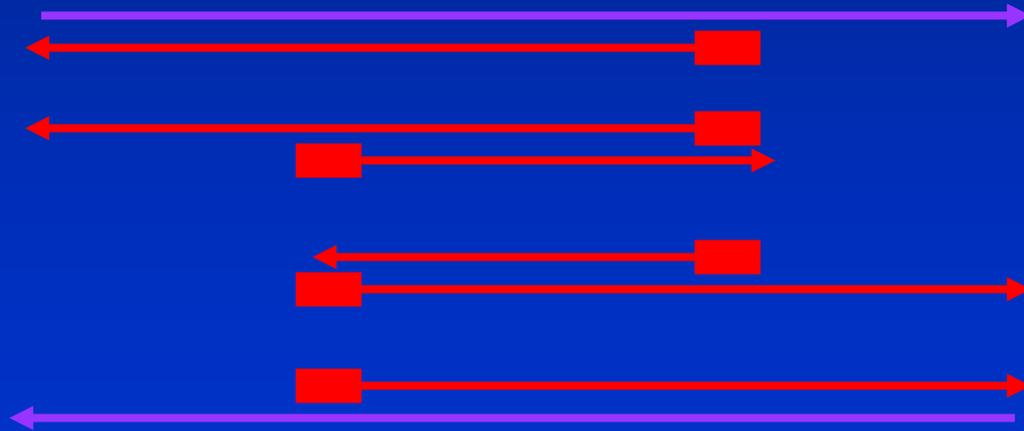
l'amplificazione avviene mediante **ripetuti cicli di polimerizzazione**, che utilizzano come stampo i due filamenti complementari di DNA e come innesco una coppia di primers, che delimitano la regione da amplificare.

LA NATURA ESPONENZIALE DELLA PCR

DNA



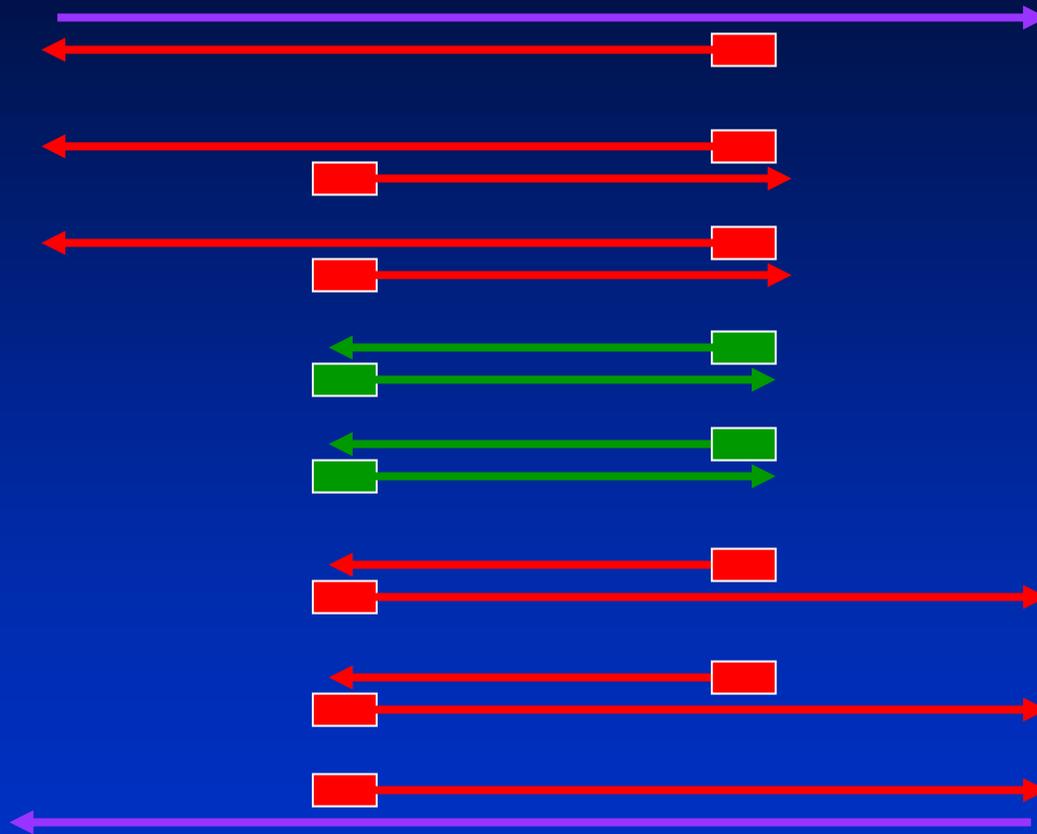
Ciclo 1



Ciclo 2



LA NATURA ESPONENZIALE DELLA PCR

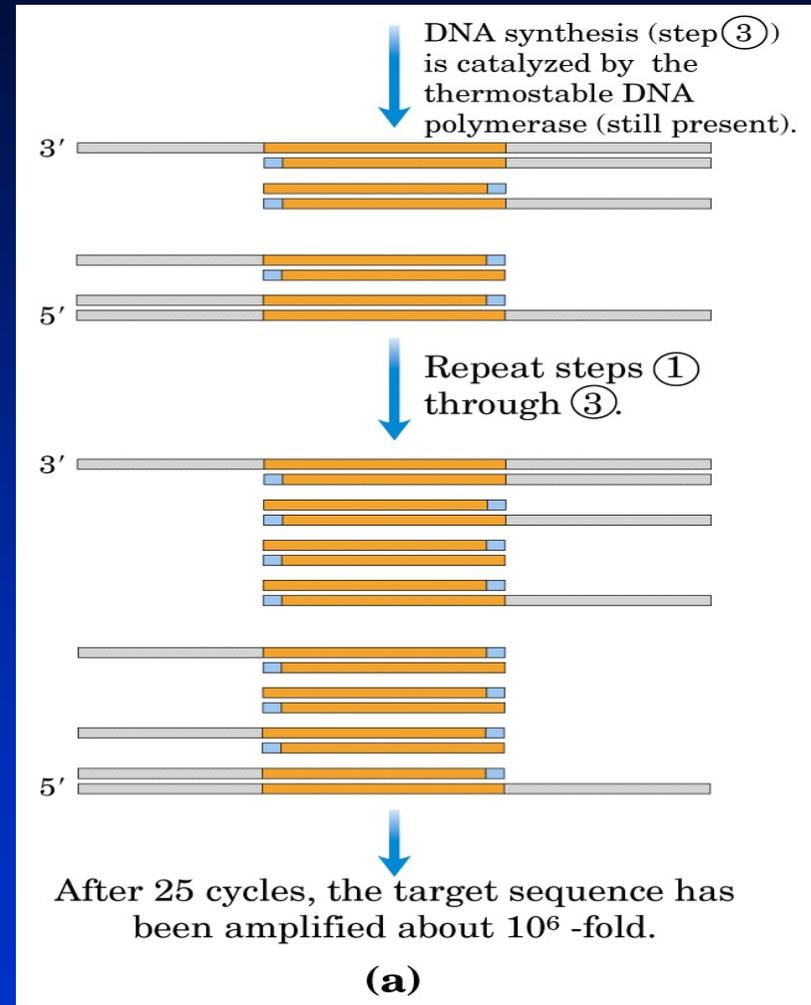
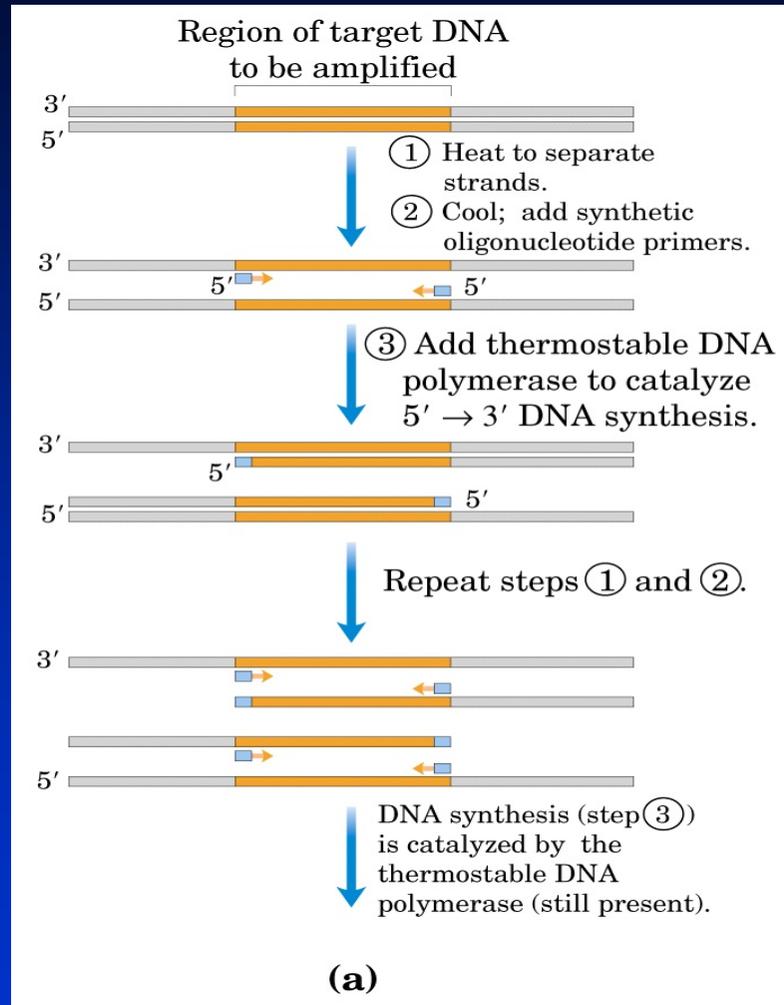


Ciclo 3



ULTERIORI AMPLIFICAZIONI

LA NATURA ESPONENZIALE DELLA PCR



GLI STRUMENTI

Il **thermal cycler** (termocicizzatore) consente lo svolgimento dei cicli necessari all'amplificazione e permette di ottenere con grande precisione e omogeneità le variazioni di temp. necessarie al compimento della reazione ciclica di PCR;

esistono strumenti che **automatizzano** la fase di estrazione, allestimento ed esecuzione dell'amplificazione, senza intervento esterno e con ridotti rischi di contaminazione da parte dei prodotti di amplificazione.

ATTENZIONE ALLE CONTAMINAZIONI !

Organizzare aree di lavoro separate,
tenere fisicamente separati i campioni,
usare puntali usa e getta,
dividere i reagenti in aliquote,
utilizzare controlli negativi,
conservare il materiale di lavoro sotto cappa a flusso laminare e
sottoporlo ad irradiazione con luce UV,
minimizzare le manipolazioni di campioni e reagenti.

LE APPLICAZIONI DELLA PCR

Applicazione analitica:

identificazione della **presenza / assenza** di determinate sequenze geniche nel campione in esame (es. identificazione di genomi virali).

Applicazione preparativa:

il campione amplificato viene utilizzato come **bersaglio** per ulteriori tecniche di biologia molecolare (es. può essere sequenziato, ibridato con specifiche sonde, sottoposto ad enzimi di restrizione, a screening per la ricerca di mutazioni, ecc).

LA PCR É DIVENTATA DI USO CORRENTE PER:

la diagnosi di infezioni batteriche e virali,

le diagnosi cliniche di malattie causate da mutazioni,

la diagnosi prenatale per l'emofilia,

il controllo dell'efficacia di terapie anti-tumorali,

la determinazione del sesso,

gli studi di evoluzione molecolare.