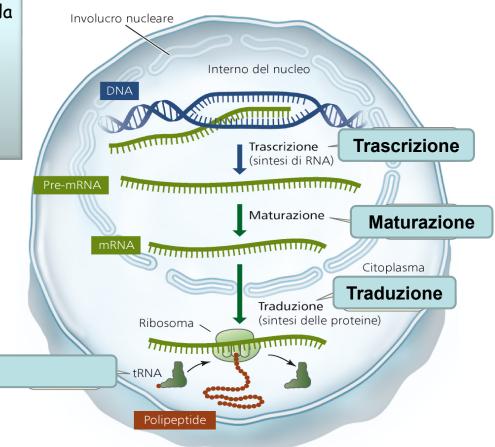


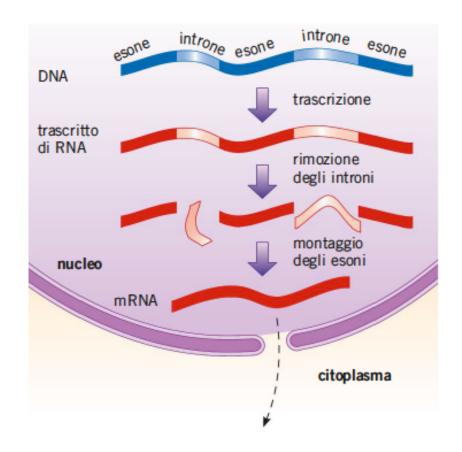
- Un gene è una porzione codificante di DNA
- Codifica per le proteine, i reali effettori delle funzioni biologiche e i determinanti dei caratteri fenotipici.
- Un gene è costituito da nucleotidi, è infatti una porzione di DNA, di lunghezza variabile, che serve a dettare l'informazione per la sintesi proteica. Al suo interno è diviso in esoni ed introni.
- Quelli che all'interno di un gene codifica realmente sono gli esoni, mentre gli introni sono delle sequenze che si pensa siano deputate, tra le altre cose, al mantenimento dell'integrità del gene in caso di mutazioni.

#### Trascrizione e traduzione

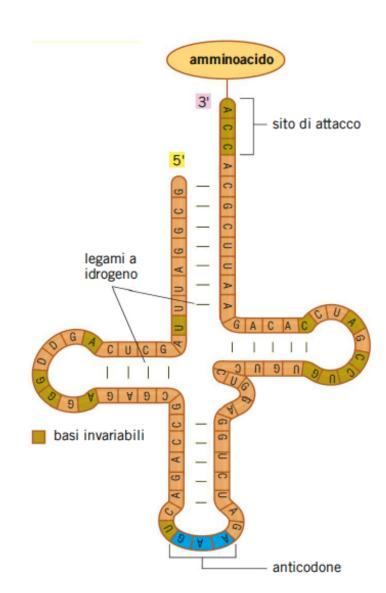
Dogma centrale della biologia molecolare: processo con cui l'informazione contenuta nel DNA dirige la sintesi delle proteine.



- Nella trascrizione la sequenza di DNA fa da stampo per produrre una catena a filamento singolo di mRNA che esce dal nucleo e si sposta nel citoplasma.
- Quando l'mRNA si trova ancora nel nucleo, alcuni enzimi eliminano gli introni e saldano gli esoni tra loro. La molecola di mRNA maturo che si genera è la sequenza che subirà il processo di traduzione. Questa operazione prende il nome di splicing dell'RNA, che significa montaggio.



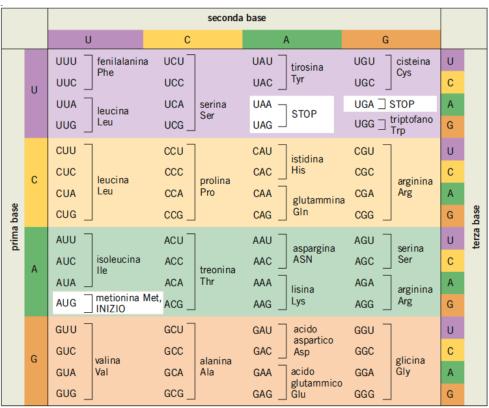
- Nella traduzione, grazie al tRNA o RNA di trasporto, dagli acidi nucleici si passa agli amminoacidi.
- L'RNA di trasporto (tRNA) traduce i codoni dell'mRNA negli amminoacidi che costituiscono le proteine.
- Il tRNA ha una forma ripiegata e porta a una estremità una tripletta di basi chiamata anticodone. Ciascun anticodone è complementare a uno specifico codone. Sull'altra estremità si trova un sito di legame per l'amminoacido codificato dal codone, che andrà ad aggiungersi alla catena polipeptidica in crescita nel ribosoma



- Un **codone**, o *tripletta*, è una «parola» di tre lettere (basi azotate) che corrisponde ad un amminoacido.
- Più codoni insieme formano una «frase» che si traduce in proteina.

• Il codice genetico è formato da 64 triplette. In tutte le specie ogni codone corrisponde allo stesso amminoacido.

I codoni sono molti di più rispetto agli amminoacidi. Si dice pertanto codice è ridondante che degenerato, triplette diverse codificano lo stesso per amminoacido. Il codice non è però ambiguo, un dato codone codifica per un solo amminoacido.

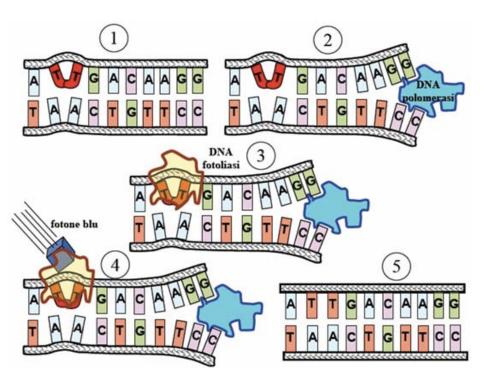


## Mutazioni genetiche

- Le mutazioni sono variazioni della sequenza nucleotidica del DNA. Possono essere causate da:
- 1. errori durante la duplicazione del DNA.
- 2. esposizione delle cellule ad agenti fisici o chimici (agenti mutageni)
- Se la mutazione avviene all'interno di una regione di DNA implicata nella produzione di una proteina, possiamo avere un'alterazione della proteina corrispondente e quindi della sua funzione.

## Mutazioni genetiche

- esposizione delle cellule ad agenti fisici o chimici (agenti mutageni). Tutto ciò che aumenta la probabilità di modificazione sostanziale del patrimonio genetico: agente mutageno.
  - Mutageni fisici: onde elettromagnetiche. Effetto raggi UV: 2 basi timina successive si legano tra loro dando errori in lettura di quel tratto di DNA, comparsa di melanomi, se non corretto dagli enzimi che controllano il DNA



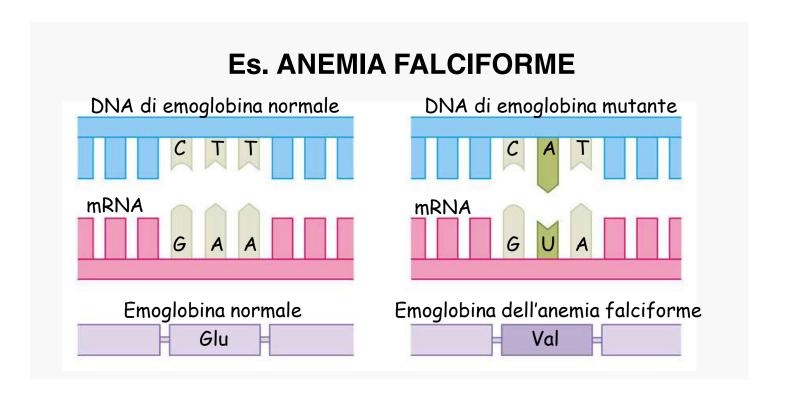
Alterazione della funzione di una proteina

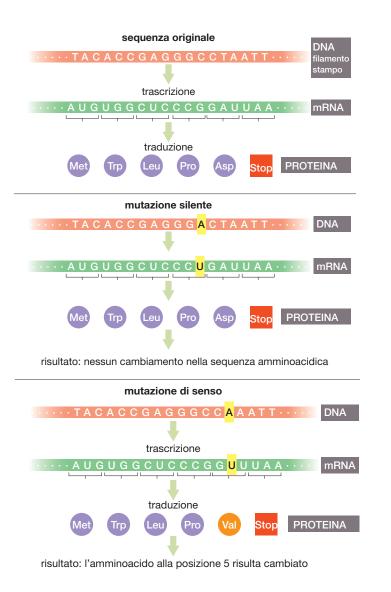
Nessun effetto sulla proteina

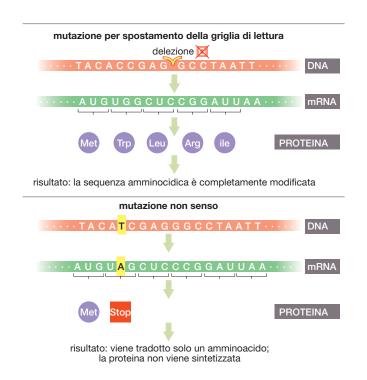
Un miglioramento della funzione

- <u>Mutazioni somatiche</u> → Non ereditabili dalla progenie
- <u>Mutazioni germinali</u> → Ereditate dalla progenie
- Mutazioni geniche o puntiformi (coinvolgono 1 o poche basi):possono risultare per sostituzione, per inserzione e delezione di una o poche basi nel DNA. Il cambiamento del fenotipo dipende dal punto esatto in cui la mutazione è situata nel gene e da quale prodotto è normalmente codificato dal gene.
- Mutazioni genomiche e cromosomiche (coinvolgono ampi tratti di DNA): Possono risultare per delezione (perdita di centinaia o migliaia di paia di basi); inserzione o duplicazione (aggiunta di nuove basi al DNA o duplicazione di un tratto di DNA); traslocazione (riposizionamento di un tratto di DNA)

 Le mutazioni possono cambiare il significato dei geni







la delezione di basi, purché non in multipli di tre, alterano la fase di lettura del messaggio genetico, che, quindi, a valle della mutazione viene completamente scombinato. Si forma una proteina alterata, che di solito non funziona.

Una mutazione nonsenso porterà alla sintesi di una proteina tronca: codone non senso (che è un segnale di termine o di stop della sintesi proteica)

## Biotecnologie

Le biotecnologie sono tutte quelle tecniche utilizzate (fin dall'antichità)
per produrre sostanze specifiche a partire da organismi viventi (quali
batteri, lieviti, cellule vegetali, cellule animali di organismi semplici o
complessi) o da loro derivati (organelli, enzimi).

#### Fin dall'antichità?

- Si utilizzavano lieviti per la produzione di birra, vino e pane, e si trasformava il latte in yogurt e formaggio attraverso batteri fermentanti di tipo lattico.
- Louis Pasteur nel 1876 individuò l'utilizzo consapevole dei microrganismi e degli enzimi da essi prodotti e consentì lo sviluppo di tecnologie in grado di realizzare prodotti utili all'uomo: le **biotecnologie.**

## Biotecnologie

- Il grande "salto" in avanti delle biotecnologie si realizzò solo dopo che Watson e
  Crick (1953) elaborarono il loro modello della struttura del DNA identificando in
  questa molecola la sede delle informazioni genetiche per la produzione di
  qualunque proteina.
- Dagli anni '70, si sviluppa una tecnologia in grado di far produrre da un organismo microscopico (riproducibile in gran quantità e a un costo relativamente limitato) una proteina di un altro organismo, impossibile da ottenere in altro modo o, comunque, ottenibile (per estrazione o per sintesi industriale) in quantità limitate o solo a costi molto elevati.
- Questa tecnologia è detta tecnologia del DNA ricombinante o ingegneria genetica

#### DNA ricombinante

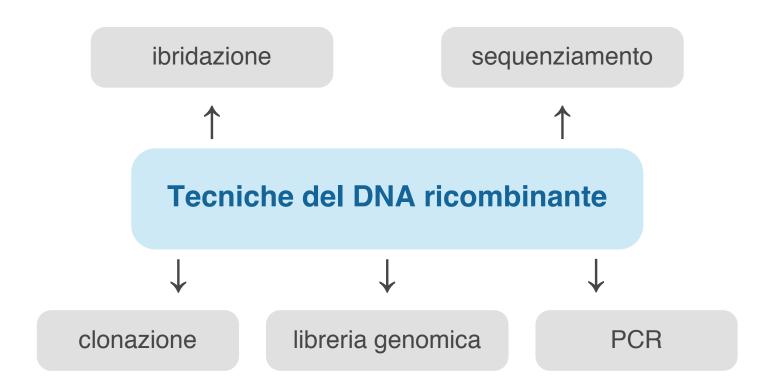
- Il DNA ricombinante è un frammento di DNA che può essere modificato e inserito in altre cellule per essere copiato più volte (amplificato) ed espresso
- Il DNA ricombinante è ottenuto dalla combinazione di materiale genetico di diversa origine

#### DNA ricombinante

#### È usato per:

- ottenere frammenti specifici di DNA in grandi quantità
- studiare la sequenza di determinati frammenti genici
- identificare particolari sequenze in un cromosoma
- studiare le modalità di espressione e regolazione genica
- creare piante o animali transgenici
- diagnosticare e curare malattie genetiche

### Tecniche del DNA ricombinante



## Clonazione genica

- Nel 1973, con il primo esperimento di clonazione di un segmento genico inserito nel batterio Escherichia coli, Stanley Cohen e Herbert Boye dimostrarono che è possibile produrre copie multiple di un determinato gene
- La clonazione molecolare serve a produrre grandi quantità di una specifica sequenza di DNA. La capacità di generare un numero quasi infinito di copie (cloni) di una particolare sequenza è alla base delle tecnologie ricombinanti del DNA

## Clonazione genica

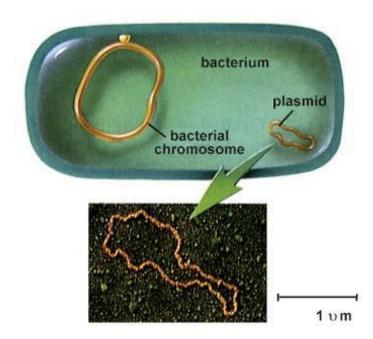
I materiali necessari per il processo di clonazione sono:

- un **frammento di DNA**, che può essere ricavato anche da un mRNA (in questo caso viene detto cDNA)
- specifici enzimi di restrizione che servono a "tagliare" il DNA
- particolari enzimi in grado di unire le estremità di nucleotidi DNA-ligasi
- i plasmidi, vettori in grado di inserirsi nelle cellule ospiti
- cellule batteriche modificate in modo da rendere la loro membrana permeabile al plasmide

### Plasmidi

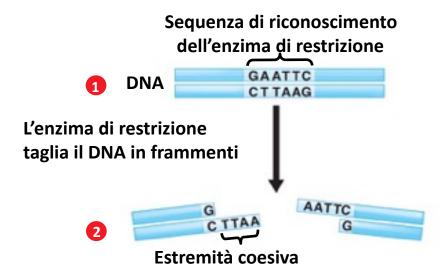
 I batteri contengono frequentemente anche una o più copie di molecole di DNA extracromosomico, per lo più circolari, di dimensioni molto più piccole di quelle del cromosoma batterico, chiamate <u>plasmidi</u>. Di solito i plasmidi non sono essenziali per la vitalità e la crescita dei batteri, ma conferiscono ad essi delle particolari caratteristiche, quali, ad esempio, la resistenza ad un antibiotico.

Alcuni plasmidi possono essere presenti in E.coli in 200-500 copie/cellula



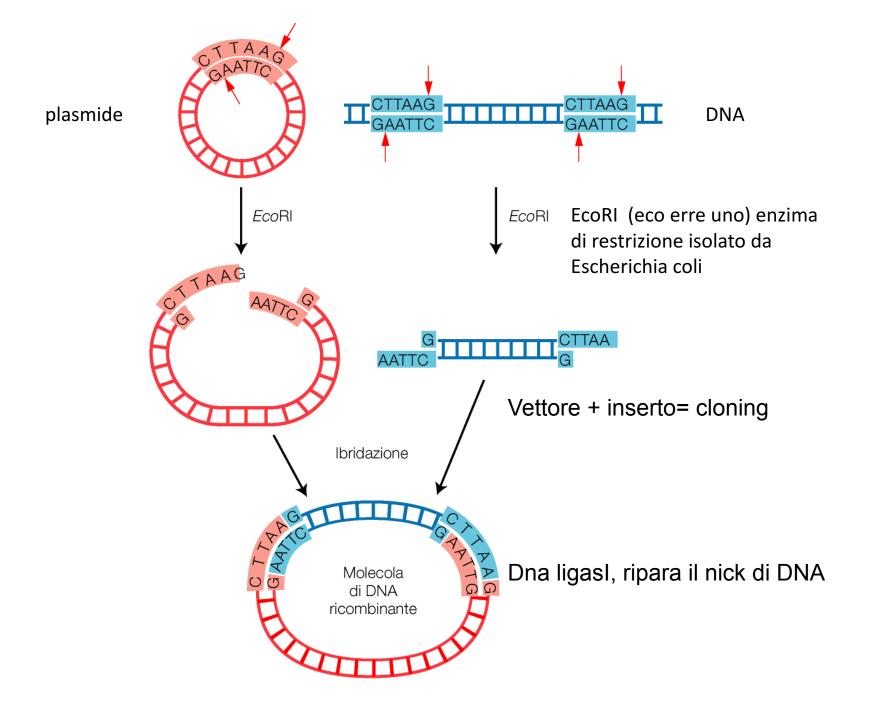
#### Enzimi di restrizione

- Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA in corrispondenza di sequenze specifiche
  - Ognuno di questi enzimi lega il DNA in corrispondenza di una specifica sequenza, il sito di restrizione
  - Molti enzimi di restrizione producono frammenti di restrizione dotati di estremità coesive, cioè a filamento singolo
  - Frammenti dotati di estremità coesive complementari possono legarsi tra loro



## Fasi della clonazione genica

- 1. Si isola un DNA plasmidico, che farà da vettore
- 2. Si isola il DNA donatore da cui si vuole estrarre il gene
- 3. Si taglia il DNA plasmidico con un enzima di restrizione
- Si taglia il DNA donatore con lo stesso enzima, ottenendo molti frammenti
- 5. Si mescolano DNA plasmidico e DNA donatore
- 6. Si aggiunge DNA ligasi, che catalizza la formazione di legami covalenti tra il DNA plasmidico e i frammenti di DNA donatore. Si ottengono così plasmidi ricombinanti che contengono frammenti del DNA donatore



## Plasmidi nel dettaglio

- **sequenza ori** (da origine), che funziona come origine di replicazione del DNA plasmidico nelle cellule batteriche ospiti. La replicazione del DNA plasmidico avviene quindi in modo indipendente dalla replicazione del DNA del cromosoma
- marcatore selettivo: geni che conferiscono la resistenza agli antibiotici, ossia la capacità di crescere in presenza dell'antibiotico ampicillina (amp) o tetraciclina (tet) o cloramfenicolo, o a più antibiotici insieme.
- zona dove è possibile "inserire" il DNA esogeno da clonare. Questa zona, che è
  chiamata polylinker, o zona di clonaggio multiplo, è costituita da un tratto di
  DNA che contiene delle sequenze, dette siti di restrizione, che sono riconosciute
  come siti di taglio da parte di enzimi di restrizione

• Grandezza della sequenza di interesse fino a 10Kb SEQUENZA DI INTERESSE

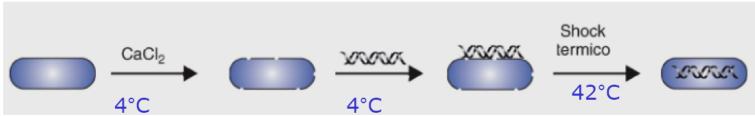
ORI

Gene codificante per resistenza ad antibiotico (amp,

kan etc)

- **Trasformazione**: Si inserisce il DNA plasmidico in una colonia di batteri, ottenendo batteri ricombinanti
- Perché il DNA entri nei batteri, essi devono essere resi permeabili momentaneamente al DNA stesso (resi competenti) tramite trattamenti chimici e fisici.

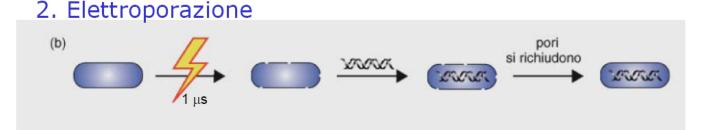
#### 1. Trasformazione chimica



Efficienza: 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cellule trasformate per μg di DNA plasmido

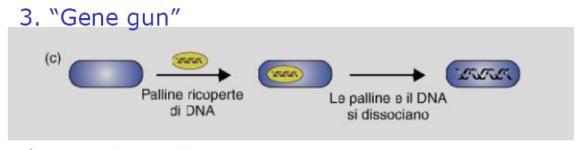
l'ingresso del DNA nelle cellule è favorito, oltre che dallo shock termico, dalla presenza degli ioni bivalenti positivi di Ca++, che vanno a mascherare le cariche negative del DNA.

• Elettroporazione: stimolazioni elettriche ad alto voltaggio che destabilizzano la membrana plasmatica e inducono la formazione di pori transienti del diametro di alcuni nanometri. Questa tecnica ha una efficacia maggiore ma richiede una quantità superiore di plasmide (l'ingresso del plasmide avverrebbe infatti solo per diffusione passiva attraverso i pori)



Efficienza: fino a 10<sup>9</sup> cellule trasformate per μg di DNA plasmido

• **Gene gun:** Il DNA viene precipitato con CaCl<sub>2</sub> su microparticelle di oro o tungsteno dal diametro di 1-4 µm. Le particelle vengono quindi sparate con gas pressurizzato alla velocità di 250 m/s contro le cellule. Utilizzabile con un gran numero di specie vegetali e con tutti i tipi di colture vegetali



Efficienza molto variabile

• Data l'efficienza non elevata della trasformazione e della reazione della ligasi, è necessario selezionare solo i batteri che hanno ricevuto il plasmide ricombinato.

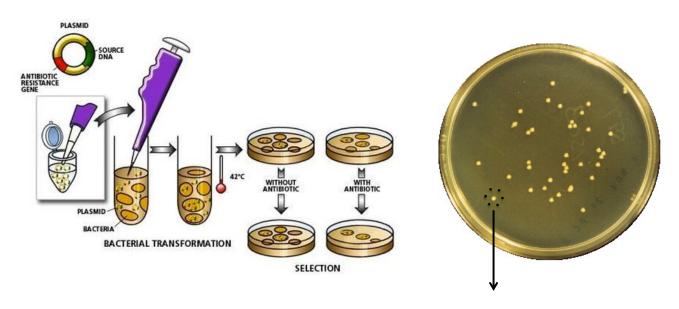
Tutti i passaggi, inserimento DNA plasmide, e trasformazione sono tutti sequenziali e possiamo avere diversi casi:

- 1. Batteri senza plasmide
- 2. Batteri con plasmide non ricombinato
- 3. Batteri con plasmidi ricombinati

# Fasi della clonazione genica: selezione cloni

- 1. Batteri senza plasmide
- 2. Batteri con plasmide non ricombinato
- 3. Batteri con plasmidi ricombinati

Aggiunta di antibiotico, seleziona batteri con plasmide (ricombinato e non).

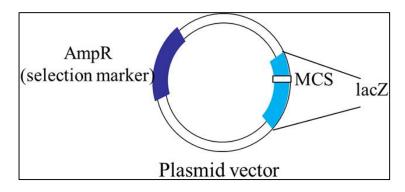


Ogni colonia deriva dalla crescita di UN SOLO BATTERIO che ha acquisito il plasmide, esso e' denominato CLONE

# Fasi della clonazione genica: selezione cloni

- 1. Batteri senza plasmide
- 2. Batteri con plasmide non ricombinato
- 3. Batteri con plasmide ricombinato I moderni vettori di clonaggio utilizzano il sistema di screening blu-bianco. DNA estraneo viene inserito in una sequenza che codifica una parte essenziale della βgalattosidasi, un enzima che produce una colonia di colore blu nel terreno di coltura. DNA estraneo nel sequenza codificante βgalattosidasi inattiva l'enzima, in modo che le colonie contenenti DNA trasformato rimangono incolore (bianco)





 Riproducendosi le cellule batteriche daranno origine a cloni di cellule identiche, ognuno contenente un frammento del DNA donatore

Recupero DNA plasmidico dai batteri dopo amplificazione, purificazione e recupero sequenza DNA d'interesse con enzimi di restrizione ed elettroforesi. Dopo elettroforesi si osserveranno quindi due bande, una corrispondente al vettore, l'altra corrispondente all'inserto. Mediante elettroforesi è possibile pertanto determinare la presenza e la dimensione del DNA clonato

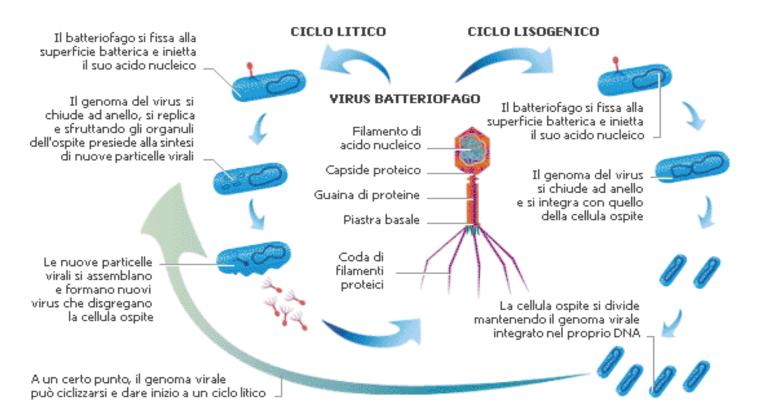
## Altri vettori per clonazione genica

## I vettori di clonaggio: differenze nelle dimensioni degli inserti

Vettore	Ospite naturale	Dimensioni inserto
Plasmidi	E. coli	5-10 kb
Fago λ	E. coli	5-25 kb
Cosmidi	E. coli	35-45 kb
Fago P1	E. coli	70-100 kb
PAC	E. coli	100-300 kb
BAC	E. Coli	≤ 300 kb
YAC	S. cerevisiae	200-2000 kb

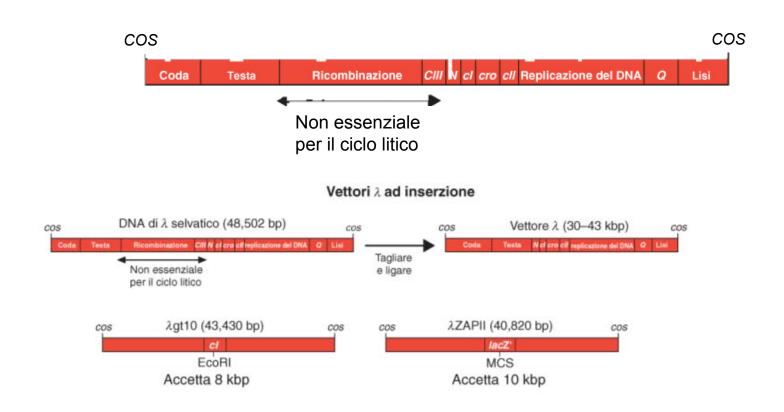
# Altri vettori per clonazione genica: fagi

- I batteriofagi sono virus in grado di infettare i batteri
- Si utilizzano quando il frammento di DNA da clonare è troppo grande per utilizzare vettori plasmidici (librerie di DNA)



# Altri vettori per clonazione genica: fagi

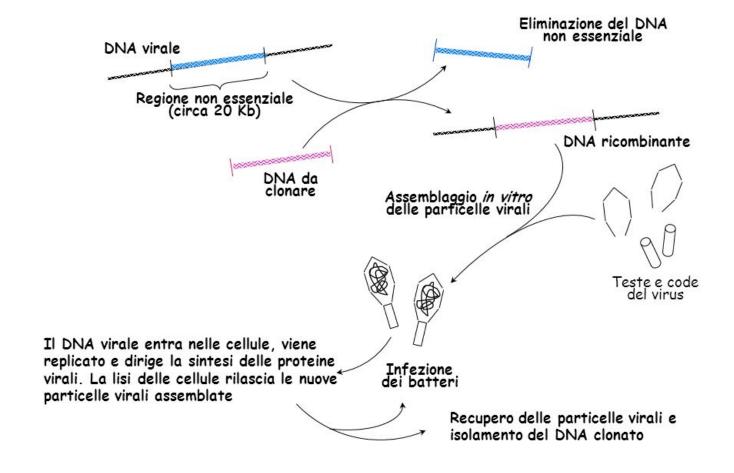
• Il genoma del fago  $\lambda$  è una molecola di DNA lineare a doppio filamento lunga 48,5 kb. Al 5' di ciascuna delle estremità è presente un prolungamento a singolo filamento di 12 nt che costituisce estremità cos (coesive)



# Altri vettori per clonazione genica: fagi

#### DNA VIRALE come VETTORE DI CLONAGGIO

Un vettore comunemente utilizzato è il batteriofago  $\lambda$ , lungo 49 Kb.

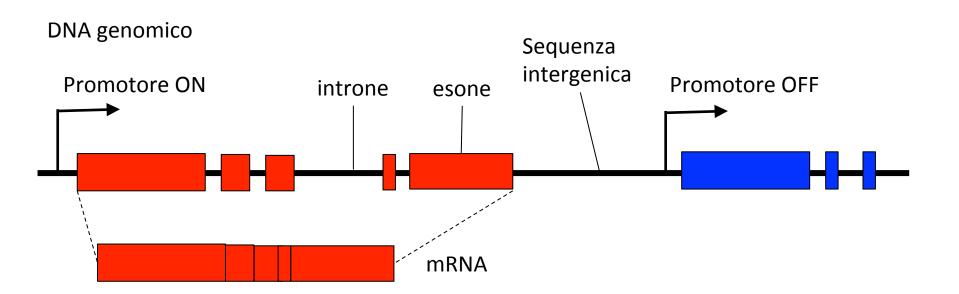


#### Librerie DNA

- I vettori sono usati per creare delle librerie di DNA a partire dal materiale genetico molti organismi diversi.
- Una DNA library è una raccolta di sequenze di DNA proveniente da un organismo, ciascuna clonata dentro un vettore al fine di permettere la sua purificazione ed analisi
- Le DNA libraries possono essere:
  - 1. Genomic libraries: costruite a partire dal DNA genomico
  - 2. cDNA libraries: costruite a partire dall'mRNA

#### mRNA e DNA differenze

 L'mRNA isolato da uno specifico tessuto, cellula o specifico stadio dello sviluppo o malattia contiene tutte le sequenze codificanti le proteine specificatamente espresse in quella condizione in aggiunta a degli mRNA housekeeping per proteine essenziali al funzionamento della cellula.



#### Libreria di cDNA

- È possibile creare una libreria che contiene tutti i geni espressi da un organismo partendo dal suo mRNA
- L'mRNA non può essere clonato direttamente dentro un vettore, deve essere quindi copiato in cDNA
- I cloni di una genoteca di cDNA rappresentano gli mRNA maturi presenti in un tipo cellulare al momento in cui è stato estratto l'RNA. Una genoteca di cDNA riflette, quindi, l'attività genica di una data popolazione cellulare in un determinato momento dello sviluppo dell'organismo. Pertanto una genoteca di cDNA è tessuto e stadio specifica.

#### Libreria di cDNA

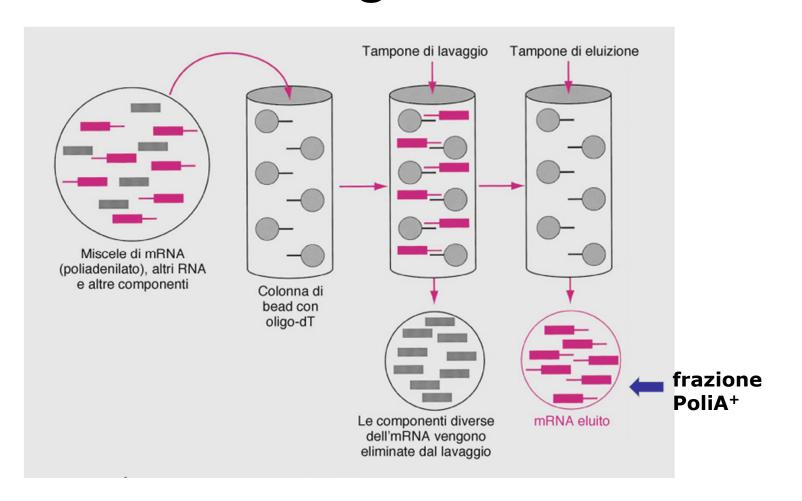
- La Costruzione della libreria di cDNA richiede:
  - Estrazione dell'RNA totale
  - Purificazione dell'mRNA mediante oligodT
  - Sintesi del cDNA
  - Clonaggio del cDNA nel vettore scelto
- Considerando che la dimensione media di un mRNA
  è intorno a 2-3 Kb, i vettori di elezione per le
  librerie di cDNA sono vettori plasmidici o vettori
  fagici ad inserzione

### Purificazione dell'mRNA mediante oligo-dT

- In seguito all'estrazione di RNA totale da una popolazione cellulare si ottiene: 10% di mRNA; 15% di tRNA; 75% di rRNA
- L'mRNA poliadenilato può ibridare con sequenze sintetiche di oligo(dT) (corti polimeri di desossitimidina), mentre le altre specie di RNA che non ibridano con l'oligo(dT) possono essere eliminate.



### Purificazione dell'mRNA mediante oligo-dT



#### Sintesi del cDNA

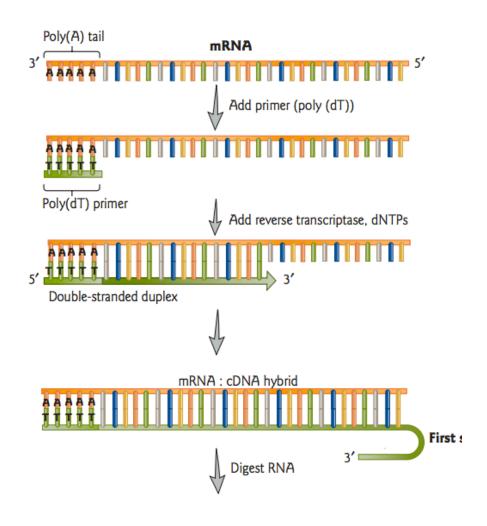
Poiché non è possibile clonare direttamente l'mRNA, è necessario convertirlo in cDNA mediante l'utilizzo della *Trascrittasi inversa*, ottenuta dai retrovirus, una DNA polimerasi RNA-dipendente

La Trascrittasi inversa possiede tre attività enzimatiche, tutte essenziali per la duplicazione virale:

- 1. attività DNA polimerasica diretta dall'RNA in direzione 5'-3' e richiede un primer.
- 2. attività RNasica H, è una attività esonucleasica in grado di degradare specificamente i filamenti di RNA appartenenti ad ibridi RNA/DNA.
- 3. attività DNA polimerasica diretta dal DNA. Mediante questa attività si ha la replicazione del DNA a singolo filamento che rimane dopo la degradazione da parte dell'RNasi H del genoma virale.

#### Sintesi del cDNA

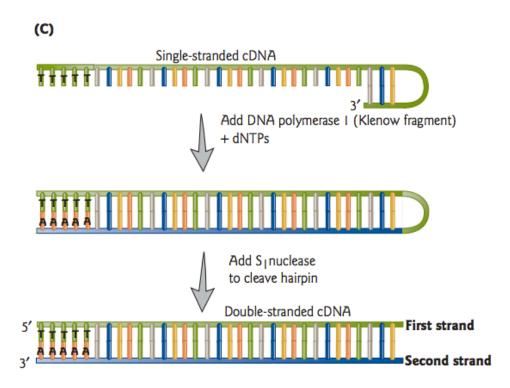
L'oligo-dT funge da innesco per la sintesi di un filamento opera di DNA della ad trascrittasi inversa. Si ottiene quindi un ibrido mRNA-cDNA, da cui l'mRNA può essere rimosso per trattamento con alcali o con la ribonucleasi H (RNasi H)



#### Sintesi del cDNA

 Rimuovendo l'RNA rimane il DNA neosintetizzato a singolo filamento, che tenderà a ripiegarsi all'estremità 3' formando una specie di ansa che può fungere da innesco per l'azione della DNA polimerasi I + dNTP

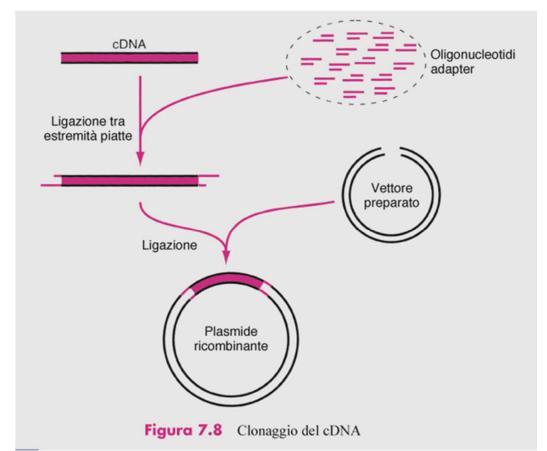
Nucleasi S1: per rimuovere
 l'ansa



strand

#### Clonaggio cDNA in vettori

 Se le estremità del cDNA sono piatte, per il clonaggio è necessario ligare degli adattatori (adapter) in modo da rendere le molecole di cDNA compatibili con il vettore scelto.



#### Screening libreria cDNA

- MA ADESSO COME LO TROVO IL GENE CHE MI INTERESSA?
- Per screening si intende il processo di identificazione del clone che contiene il gene di interesse tra I milioni di altri cloni presenti in una library.
- Uno screening si può basare sulla:
  - 1. Sequenza nucleotidica di un gene
  - 2. Sequenza amminoacidica di un gene
  - 3. Sulla sua funzione (functional screening)

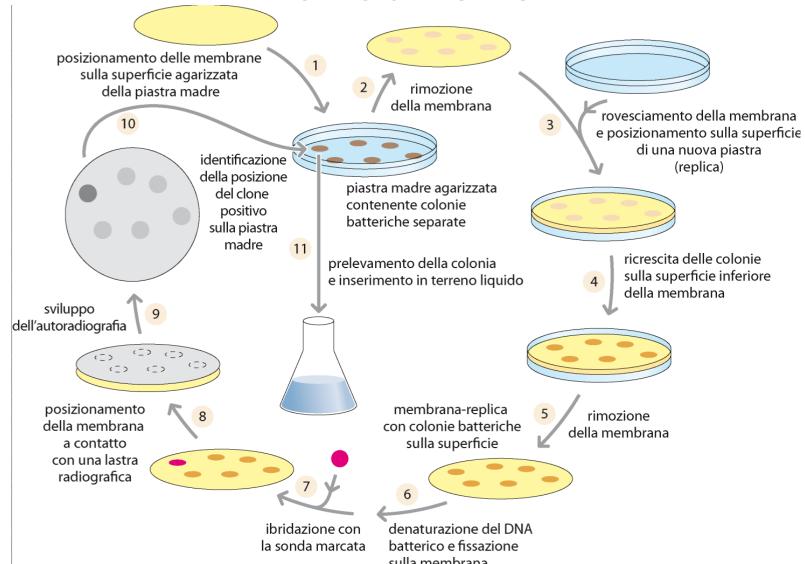
#### Screening libreria cDNA per ibridazione

- Uno dei metodi per trovare una specifica sequenza di DNA è utilizzare una sonda che ne riconosca la sequenza.
- Riconoscere la sequenza vuol dire che la la sonda deve essere un acido nucleico con una sequenza complementare (anche parzialmente) alla sequenza da riconoscere
- Il processo per cui due frammenti di DNA denaturati, si associano, in modo sequenza-specifico, una volta rinaturati si chiama: IBRIDAZIONE

#### Screening libreria cDNA per ibridazione

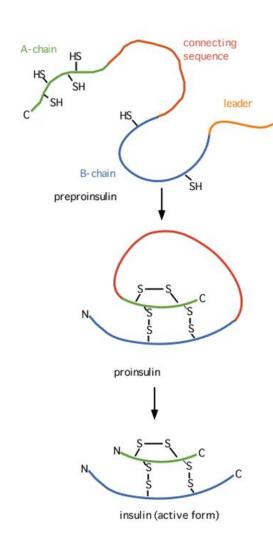
- La sonda deve essere poi "riconoscibile" dall'operatore, deve essere quindi marcata.
   Esistono due metodi di marcatura:
  - radioattiva, la sonda incorpora nucleotidi radioattivi. E' rilevabile tramite autoradiografia.
  - non radioattiva, la sonda incorpora nucleotidi modificati con una molecola riconoscibile da specifici anticorpi.
     Per la rilevazione si usa un protocollo di immunodetezione.

#### Screening libreria cDNA per ibridazione



#### Insulina ricombinante

- L'insulina nella sua forma attiva è costituita da due catene polipeptidiche (A, B) formate da 21 e 30 amminoacidi tenute insieme da ponti disolfuro.
- La proinsulina viene poi convertita in insulina attraverso il clivaggio del polipeptide centrale le due unità sono tenute insieme da ponti disolfuro.
- Il gene dell'insulina codifica per un'unica e lunga catena polipeptidica chiamata proinsulina.

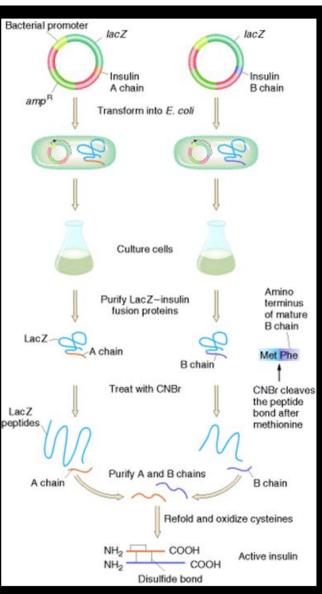


#### Insulina ricombinante

- Per risolvere il problema sono stati due approcci, il primo prevede l'inserimento nel batterio del gene tal quale e successivo clivaggio chimico del prodotto ottenuto con asportazione del polipeptide centrale.
- Produzione da parte di due colture batteriche di delle singole catene A e B e quindi legame chimico tra di loro per ottenere la molecola attiva.
- Per ottenere il gene umano sono state usate tecniche differenti (è molto difficile isolare un singolo gene dal genoma umano), un primo metodo è isolare dal pancreas l'mRNA che codifica per l'ormone insulina e retro trascriverlo in una copia di DNA (sono presenti elevate quantità di mRNA nelle cellule beta)
- Il gene può essere anche sintetizzato a partire dalla sequenza di amminoacidi presenti nella molecola della proinsulina e insulina, nella corretta sequenza nucleotidica.

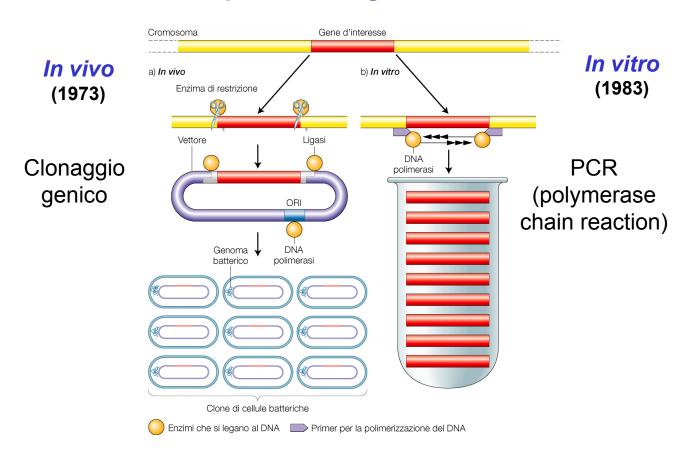
Insulina ricombinante

 Dopo avere ottenuto il gene dell'insulina derivato da RNA o dopo sintesi chimica nel genoma Escherichia coli che commissionato alla produzione di insulina umana.



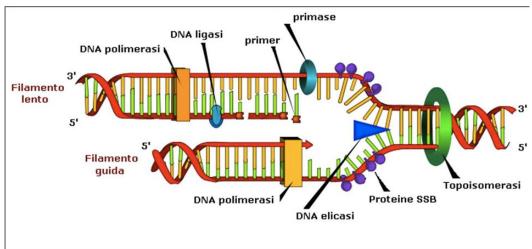
- La Polymerase Chain Reaction (PCR) o reazione di amplificazione a catena è una tecnica che permette di amplificare una specifica sequenza di DNA milioni di volte in poche ore. La tecnica è stata inventata nel 1983 da Kary Mullis che ricevette per questo il premio Nobel per la chimica 10 anni dopo
- L'amplificazione della sequenza bersaglio è, in teoria, uguale a 2n. Cioè se vengono effettuati 32 cicli di PCR la sequenza bersaglio si sarà amplificata 232 volte (= 1 073 741 824 ! di volte)

2 metodi per isolare geni di interesse



	Clonaggio genico	PCR
Conoscenza sequenza genica	Non necessaria	Necessaria
Tempi di realizzazione	Lunghi	Molto brevi
Lunghezza DNA amplificato	Variabile (anche molto grande)	Limitata
Accuratezza	Elevata	Bassa
Rischi contaminazione	Bassi	Elevati

- La **PCR** sta rivoluzionando molte aree della ricerca in genetica, quali la diagnosi delle malattie genetiche, la genetica forense, lo studio dei genomi e dell'evoluzione molecolare
- In una cellula che sta per dividersi, la replicazione (duplicazione) del DNA implica una serie di reazioni mediate da enzimi specifici, che portano alla formazione di una copia fedele dell'intero genoma. Uno dei passaggi essenziali di questo processo è la formazione di un innesco (in inglese primer) per l'attacco dell'enzima DNA polimerasi, la quale poi produce il nuovo filamento di DNA, complementare a quello preesistente. La sintesi consiste nel concatenamento dei nucleotidi a partire da precursori liberi.



 La PCR consiste nella ripetizione in provetta di questi passaggi per numerosi cicli.

Gli elementi essenziali della reazione, ovvero

- i primer
- i precursori
- l'enzima DNA polimerasi
- il DNA da duplicare

devono essere introdotti nella reazione dallo sperimentatore

• Durante la PCR, per separare le molecole del DNA in singoli filamenti, si aumenta la temperatura e delle brevi sequenze di DNA sintetizzato artificialmente a singolo filamento (20-30 nucleotidi) vengono usate come primers. Due diverse sequenze di primers sono utilizzate per permettere l'amplificazione della regione bersaglio; un primer è complementare a un filamento di DNA all'inizio della regione bersaglio; un secondo primer è complementare all'altro filamento, alla fine della regione bersaglio.

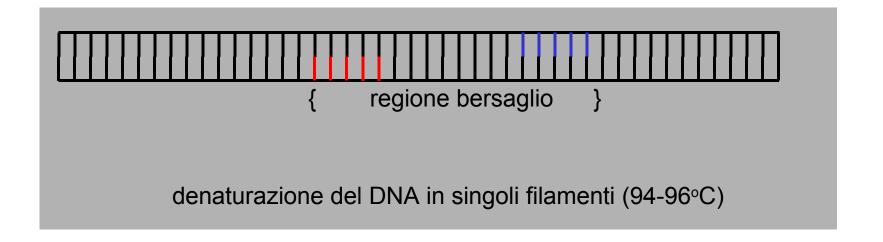
Una piccola quantità di DNA contenente il bersaglio è aggiunta a una provetta con una soluzione che contiene:

- la DNA polimerasi dal batterio Thermus aquaticus. Questo enzima detto "Taq" DNA polimerasi, resta attivo nonostante i ripetuti aumenti di temperatura nei vari cicli;
- i piccoli primers oligonucleotidici,
- i 4 desossinucleotidi che servono per costruire il DNA,
- il cofattore MgCl 2 per la DNA polimerasi

### PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 1° ciclo

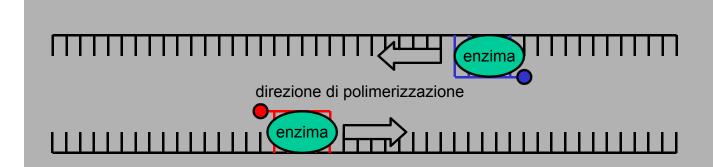
La miscela di PCR è sottoposta a una serie di cicli ripetuti che consistono in:

1. Denaturazione del DNA in singoli filamenti (94-96°C) 30-60s e ogni reazione enzimatica si stoppa.



### PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 1° ciclo

2. Ibridazione (annealing) dei primers alla loro sequenza complementare, ad entrambe le estremità delle sequenze (50-65°C) 30-60 sec. Legami idrogeno si formano e si rompono continuamente tra primers e filamento stampo. Se i primers si adattano perfettamente allo stampo, i legami idrogeno sono così forti che gli inneschi rimangono attaccati

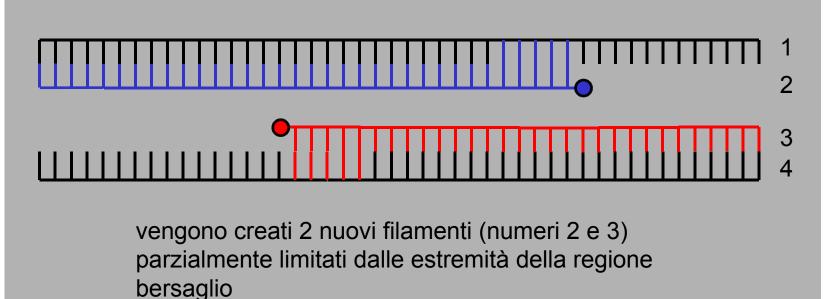


ibridazione (annealing) dei primers (50-65°C)

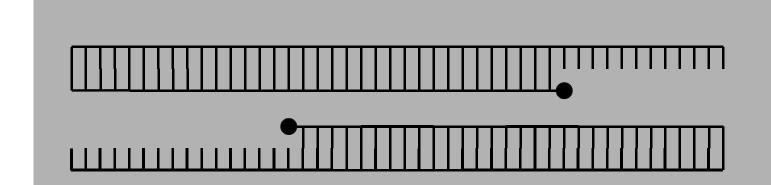
estensione dei filamenti di DNA mediante l'enzima DNA polimerasi

### PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 1° ciclo

• Estensione di ciascuno dei due filamenti di DNA a partire da ogni primer, mediante l'enzima DNA polimerasi (72°C) 1 min. La polimerasi aggiunge dNTP agli inneschi in direzione 5'->3', leggendo lo stampo in direzione 3'->5'; le basi aggiunte sono complementari al filamento stampo.

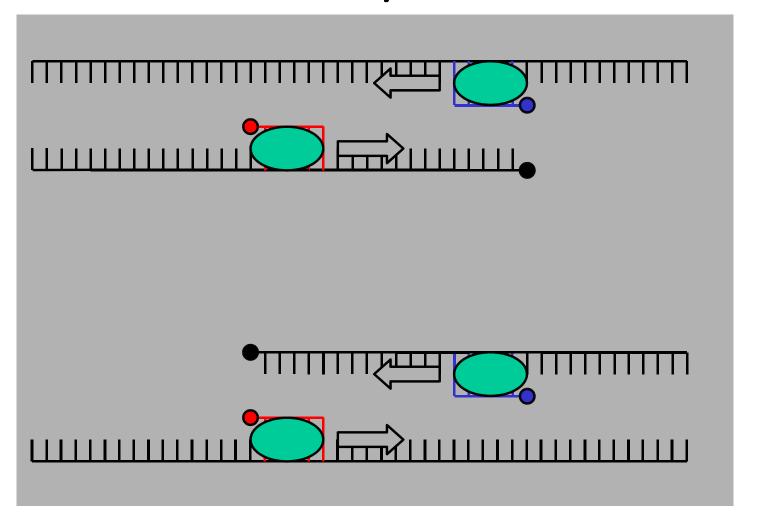


## PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 2° ciclo

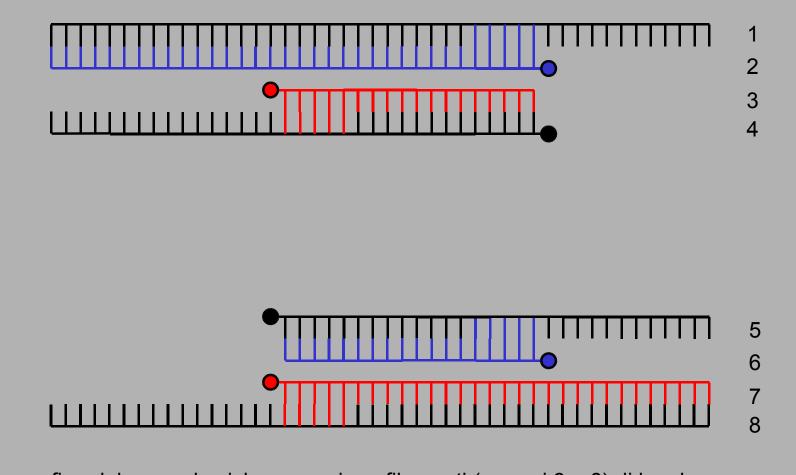


inizio del secondo ciclo: il processo si ripete sulle nuove coppie di filamenti prodotte

## PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 2° ciclo

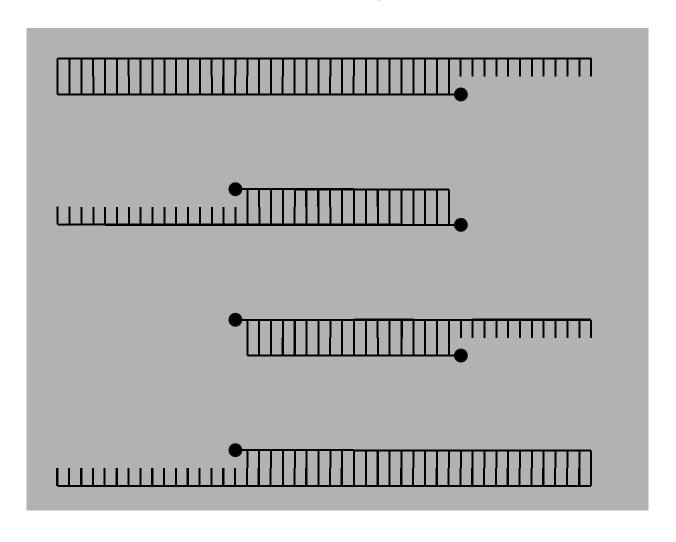


### PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 2° ciclo

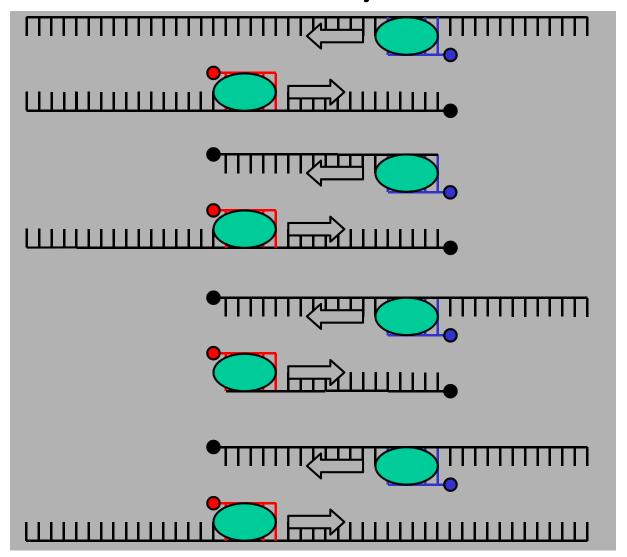


fine del secondo ciclo: compaiono filamenti (numeri 3 e 6) di lunghezza definita e pari alla dimensione della regione bersaglio

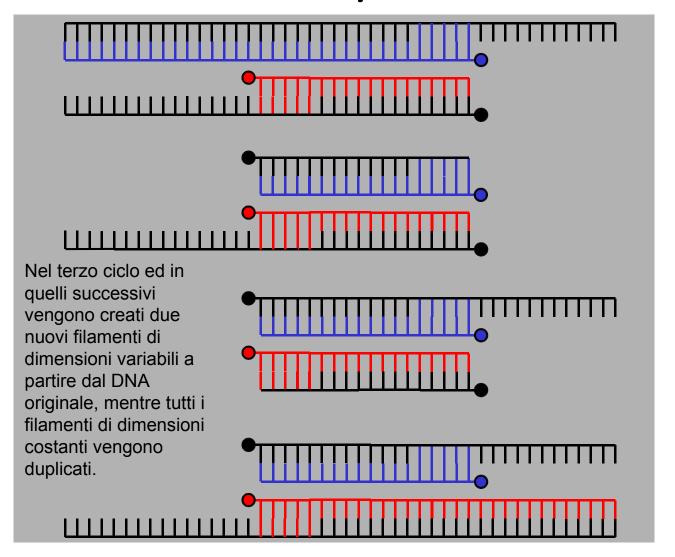
## PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 3° ciclo



# PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 3° ciclo



## PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 3° ciclo

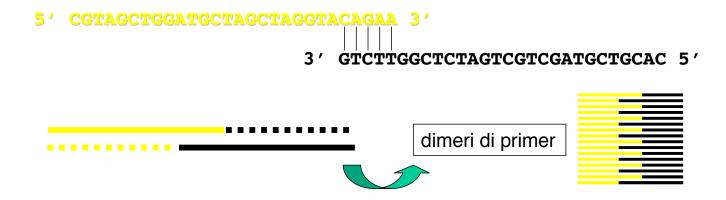


#### PCR Taq polimerasi

- La Taq DNA polimerasi ha attività polimerasica 5'-3' e attività esonucleasica 5'-3' ma manca di attività esonucleasica 3'-5' (proofreading)
- Incorpora, in media, una base sbagliata ogni 10<sup>4</sup> basi replicate
- Questa caratteristica non è rilevante nelle tecniche analitiche ma può essere un problema se la sequenza amplificata deve essere utilizzata per studi funzionali e nei clonaggi.
- Esistono in commercio DNA polimerasi termostabili, con attività proofreading e con tassi di errore più bassi che permettono di amplificare frammenti lunghi fino a 40 kB

#### Caratteristiche dei primers

- Evitare la complementarietà tra i 2 primers
- Evitare primers che possono formare strutture secondarie
- Le sequenze dei primers possono anche includere regioni utili per le applicazioni successive; es. siti di restrizione.
- Dimensioni 18 20 nucleotidi per avere alta specificità

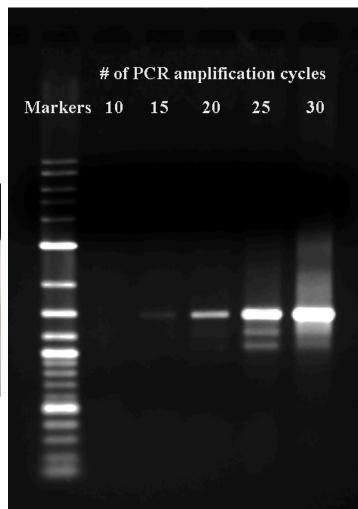


 Al termine della reazione il prodotto della PCR è analizzato per gel elettroforesi in un gel di agarosio



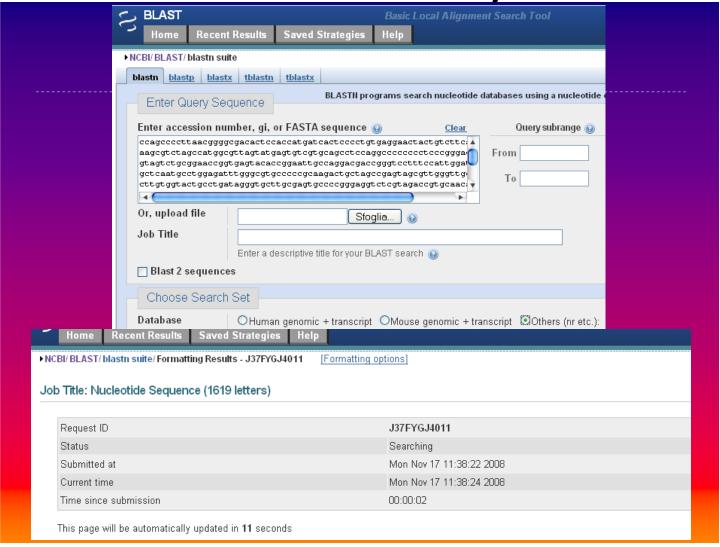


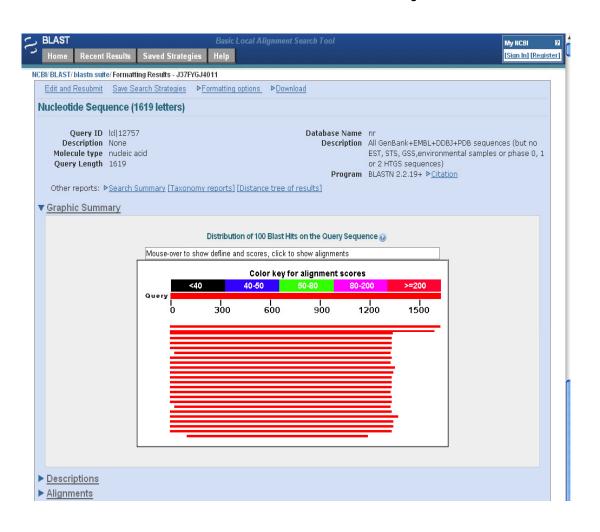
 I prodotti della PCR arrivano ad un massimo di lunghezza di 10 kb, ma la maggior parte delle amplificazioni sono nel range di 1 kb od al di sotto. Per prodotti di 400 – 1000 basi l'elettroforesi su gel di agarosio è certamente indicata





- La sequenza nucleotidica viene determinata grazie a sequenziatori automatici e viene comparata con quella in letteratura GenBank
- Banca dati ad accesso libero
- Circa 50 milioni di sequenze geniche (animali e vegetali)
- Permette il confronto della propria sequenza in tempo reale: motore di ricerca (programma blast) individua le sequenze con il più elevato grado di omologia
- Chiunque può depositarvi le proprie sequenze





Sequences producing significant alignments: (Click headers to sort columns)							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Linl
D84262.2	Hepatitis C virus (isolate Th580) genomic RNA, complete genome	2990	2990	100%	0.0	100%	
D37841.1	Hepatitis C virus gene for core, env, and part of E2/NS1, partial cd	2924	2924	97%	0.0	100%	
AY231583.1	Hepatitis C virus isolate NB56 polyprotein gene, partial cds	2833	2833	94%	0.0	100%	
D88469.1	Hepatitis C virus genomic RNA for core, env and part of E2/NS1, pa	1583	1583	92%	0.0	85%	
D88473.1	Hepatitis C virus genomic RNA for core, env and part of E2/NS1, pa	<u>1550</u>	1550	92%	0.0	85%	
DQ480513.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a35, complete genome	<u>1515</u>	1515	97%	0.0	84%	
EU246930.1	Hepatitis C virus strain D9 polyprotein gene, complete cds	<u>1513</u>	1513	98%	0.0	84%	
DQ480512.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a77, complete genome	<u>1509</u>	1509	97%	0.0	84%	
00480517.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a73, complete genome	1498	1498	89%	0.0	85%	
DQ480516.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a61, complete genome	1498	1498	90%	0.0	85%	
088476.1	Hepatitis C virus genomic RNA for core, env and part of E2/NS1, pa	1495	1495	92%	0.0	84%	
088475. <u>1</u>	Hepatitis C virus genomic RNA for core, env and part of E2/NS1, pa	<u>1489</u>	1489	92%	0.0	84%	
DQ480522.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a72, complete genome	1482	1482	97%	0.0	83%	
DQ480521.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a69, complete genome	1482	1482	97%	0.0	83%	
DQ480520.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a67, complete genome	1482	1482	97%	0.0	83%	
DQ480515.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a64, complete genome	1480	1480	96%	0.0	84%	
DQ480518.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a65, complete genome	<u>1476</u>	1476	97%	0.0	83%	
DQ480519.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a66, complete genome	1471	1471	90%	0.0	85%	
DQ480523.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a62, complete genome	1465	1465	97%	0.0	83%	
DQ480514.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a63, complete genome	<u>1452</u>	1452	97%	0.0	83%	
AY859526.1	Hepatitis C virus (isolate 6a33), complete genome	<u>1441</u>	1441	90%	0.0	84%	
DQ480524.1	Hepatitis C virus subtype 6a strain 6a74, complete genome	<u>1371</u>	1371	89%	0.0	83%	
<u>Y12083.1</u>	Hepatitis C virus genotype 6a RNA for HCV polyprotein	<u>1341</u>	1341	96%	0.0	82%	
DQ835769.1	Hepatitis C virus subtype 6j isolate Th553, complete genome	1339	1339	81%	0.0	85%	
D37848.1	Hepatitis C virus gene for core, env, and part of E2/NS1, partial cd	<u>1339</u>	1339	81%	0.0	85%	
D37851.1	Hepatitis C virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: ThKF68	<u>1314</u>	1314	82%	0.0	84%	

#### **BLAST Assembled Genomes**

Choose a species genome to search, or list all genomic BLAST databases.

- Human
- Mouse
- Rat
- Arabidopsis thaliana

- Oryza sativa
- Bos taurus
- Danio rerio
- Drosophila melanogaster
- Gallus gallus
- Pan troglodytes
- Microbes
- Apis mellifera

#### **Basic BLAST**

Choose a BLAST program to run.

nucleotide blast	Search a <b>nucleotide</b> database using a <b>nucleotide</b> query  Algorithms: blastn, megablast, discontiguous megablast
protein blast	Search <b>protein</b> database using a <b>protein</b> query  Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast
<u>blastx</u>	Search protein database using a translated nucleotide query
<u>tblastn</u>	Search translated nucleotide database using a protein query
<u>tblastx</u>	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

#### **UTILIZZO DELLA PCR**

- Strategie di clonaggio molecolare;
- Analisi dell'espressione genica (RT-PCR);
- Analisi di medicina legale quando si isolano minuscoli campioni di DNA dalla scena di un crimine;
- Test diagnostici di malattie genetiche;
- Diagnosi di infezioni virali o batterriche (HIV, Epatite C, Mycobacterium tubercolosis).

### Vantaggi

- E' più veloce rispetto al clonaggio tramite vettori
- E' sufficiente una piccola quantità di DNA
- E' una tecnica altamente selettiva e sensibile (DNA non purificato)

### Svantaggi

- Per sintetizzare i primers bisogna conoscere le sequenze alle estremità del frammento di interesse
- Si può impiegare solo per amplificare frammenti corti
- Problema dei falsi positivi (mismatch dei primers e contaminazioni di DNA

#### L'amplificazione della PCR non e' indefinita:

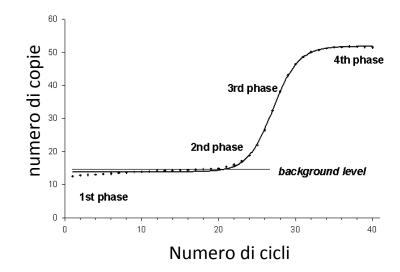
- Fase di amplificazione esponenziale: 2n copie di prodotto, dove n e' il numero del ciclo
- Leveling off stage: la reazione rallenta a causa della perdita di attività della polimerasi e del consumo dei primers
- Plateau: non si accumula più prodotto

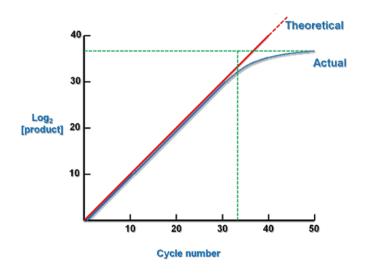
#### Resa teorica PCR

$$P=(2)^{n} T$$

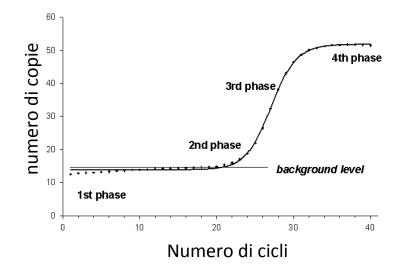
numero di cicli di PCR (n) e dipende da T, numero di copie di template di partenza

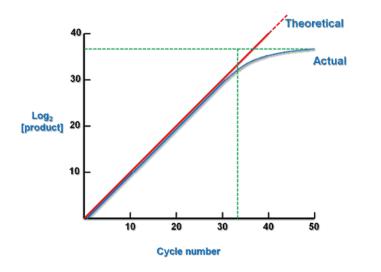
Resa effettiva: effetto plateau P=(1+e)<sup>n</sup> T



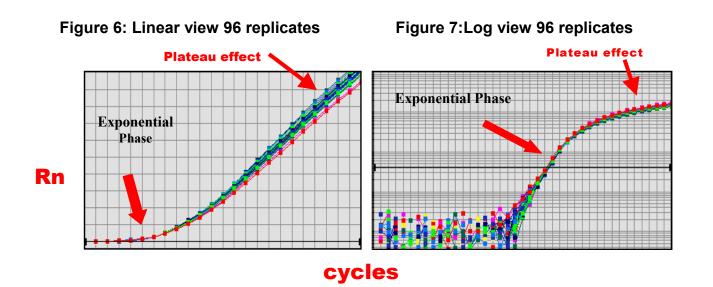


- La PCR end-point (portata fino a plateu)
  non è un metodo quantitativo ma
  qualitativo.
- Alla fine della reazione non sempre la quantità di DNA del campione d'origine è proporzionale all'intensità della banda ottenuta.
- Utilizzando particolari accorgimenti può diventare un metodo semi-quantitativo.



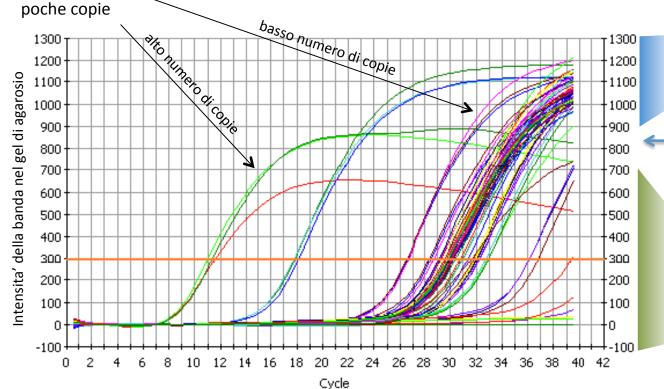


• Figura 7, il plateau per ogni reazione sembra essere uguale. In figura 6 vengono mostrati i 96 replicati nel grafico lineare. È evidente una chiara separazione nella fase di plateau; per cui se le misure vengono fatte nella fase plateau si avrà un errore nella quantificazione.



Il limite principale è che la quantità di copie di DNA prodotta è analizzata al termine della reazione, quindi quando tutte le reazioni di PCR tra campioni diversi sono nella fase di plateau.

Campioni con piu' copie di partenza per il cDNA analizzato supereranno la soglia di detection del gel di agarosio ad un minor numero di cicli rispetto a campioni con



Questi campioni verranno valutati come uguali, erroneamente

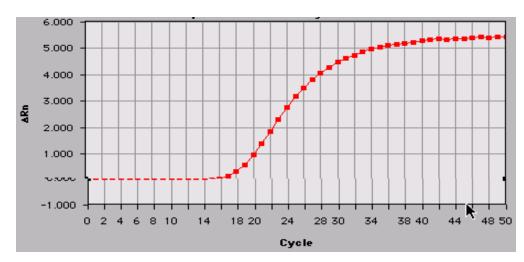
Limite di visibilita in gel di agarosio

Questi campioni verranno valutati come meno espressi, quindi correttamente

Per cui la quantità di DNA deve avvenire la fase esponenziale della PCR (non visibile nel gel di agarosio)

- Rilevamento della fluorescenza associata all'amplificazione
- Il prodotto di PCR non viene analizzato su gel di agarosio
- Analisi del prodotto di fluorescenza tramite computer

Incremento di fluorescenza



Cicli di PCR

Quantificazione assoluta

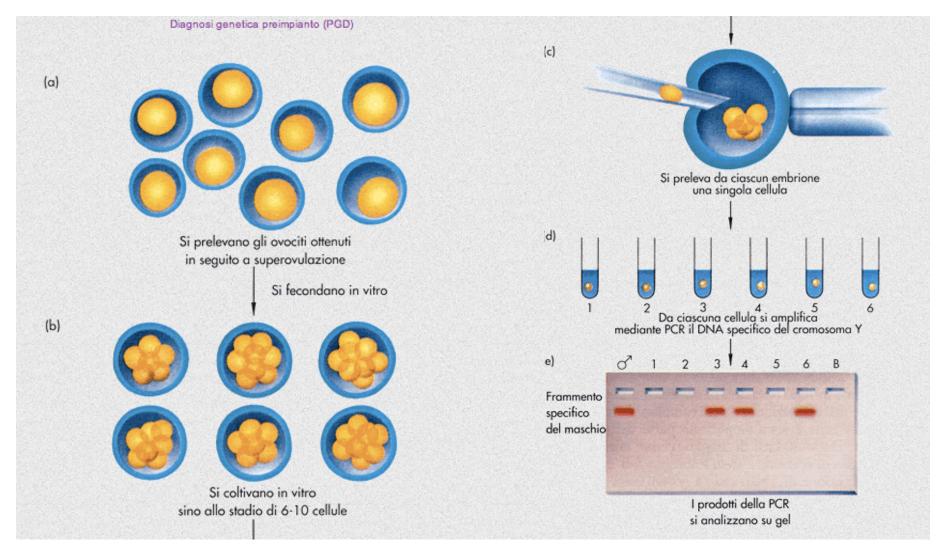
Tramite curva di calibrazione con standard

Quantificazione relativa

• Confronto con controlli endogeni

- La fluorescenza si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche.
- Le chimiche principali sono basate sia sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, come il SYBR Green, sia sull'ibridazione di sonde specifiche

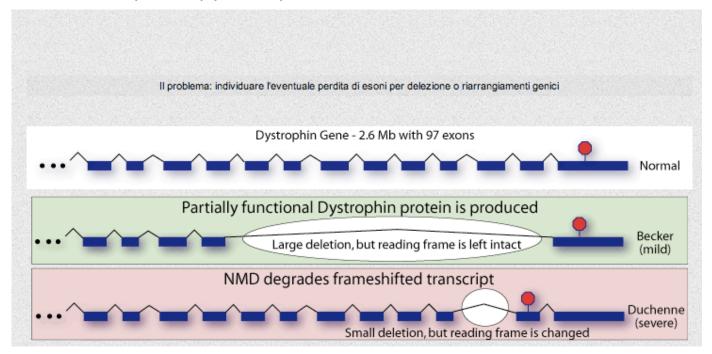
# Utilizzo della PCR per diagnostica PCR per la diagnosi preimpianto



### Utilizzo della PCR per diagnostica

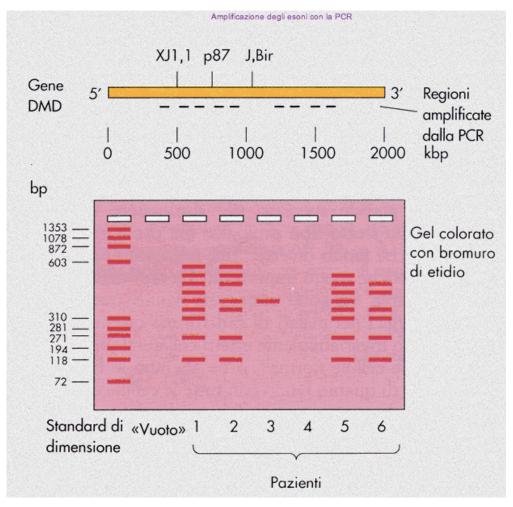
Molte malattie, dalle malattie genetiche ai tumori, hanno una base genetica, e quindi possiamo sfruttare la PCR per la rilevazione di specifici errori della sequenza del genoma.

- Esempio: diagnosi della distrofia muscolare di Duchenne (DMD)
- PCR "multiplex", per amplificare diversi segmenti genomici nella stessa reazione: vengono utilizzate più coppie di primer



### Utilizzo della PCR per diagnostica

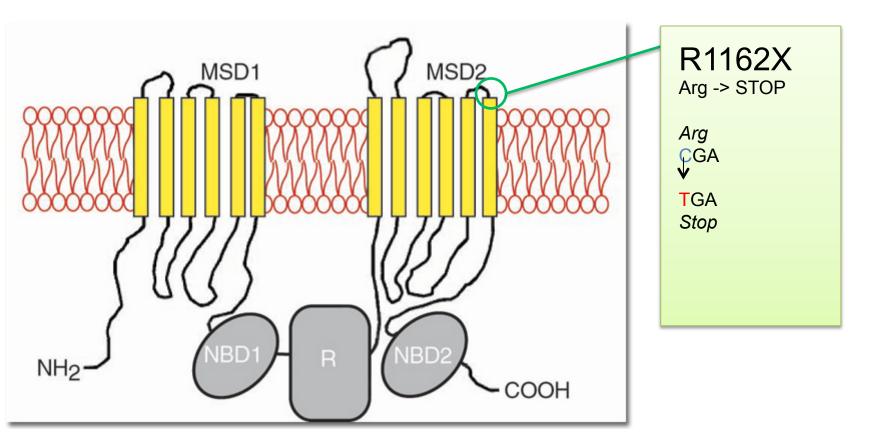
Amplificazione di 9 esoni



## Utilizzo della PCR per la diagnosi della fibrosi cistica

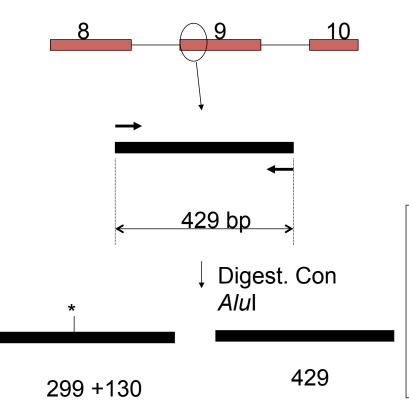
Mutazione R1162X. Il difetto è costituito dalla comparsa nella sequenza del DNA del gene CFTR di un "codone di terminazione".

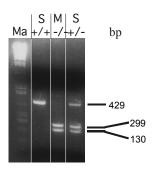
• Questa mutazione si associa clinicamente a fibrosi cistica classica, con insufficienza pancreatica.



## Utilizzo della PCR per la diagnosi della fibrosi cistica

#### **Gene CFTR**

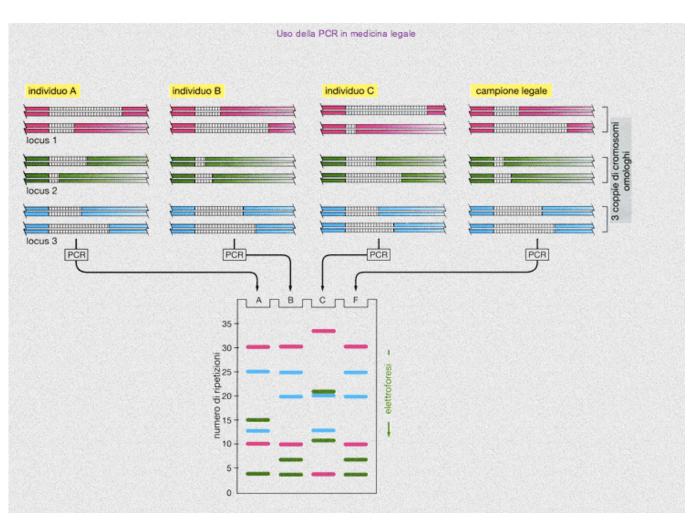




Le amplificazioni mediante PCR sono state eseguite a partire da campioni di DNA estratti da due individui sani (S) e da un individuo affetto dalla malattia (M). In uno dei due individui sani è presente solamente l'allele normale (+/+), mentre nell'altro sono presenti entrambi gli alleli (+/-). Nell'individuo malato infine è presente solamente l'allele mutato (-/-). Ma indica un marcatore di pesi molecolari.

La fibrosi cistica è causata da più di 1000 mutazioni diverse nel gene CFTR. Le diverse mutazioni possono produrre fenotipi di gravità diversa.

### Utilizzo della PCR Medicina forense



# Utilizzo della PCR espressione genica RT-PCR

- RT-PCR fornisce informazioni semi-quantitative, cioe' indica quanto un gene sia espresso in un campione rispetto ad un altro (diversi stadi di sviluppo, malattia vs sano etc). Non fornisce il numero assoluto di copie di mRNA espresse in una cellula.
- 1. Purificazione dell'mRNA da cellule/tessuti
- 2. Sintesi del cDNA
- 3. Utilizzo del cDNA come stampo per reazione di PCR
- 4. Analisi degli amplificati su gel di agarosio

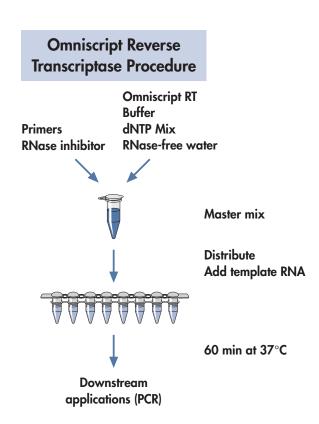
### RT-PCR

## (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Il DNA da amplificare deriva dalla retrotrascrizione dell'mRNA.

### La retrotrascrizione richiede (kit commerciali):

- 1. Un tampone
- 2. Una RT DNA polimerasi (di origine retrovirale)
- 3. Miscela di mRNA contenente la sequenza da amplificare
- 4. Primer oligo dT



### RT-PCR

- Analisi a partire da piccole quantità di RNA totale, svantaggio: non si sa la lunghezza del cDNA o mRNA
- RNA è molto instabile e vanno usati degli inibitori delle Rnasi per evitare che si degradino. Il cDNA è molto più stabile e si conserva meglio e più a lungo
- Le Rnasi resistono a trattamenti drastici (sterilizzazione in autoclave, temp elevate)

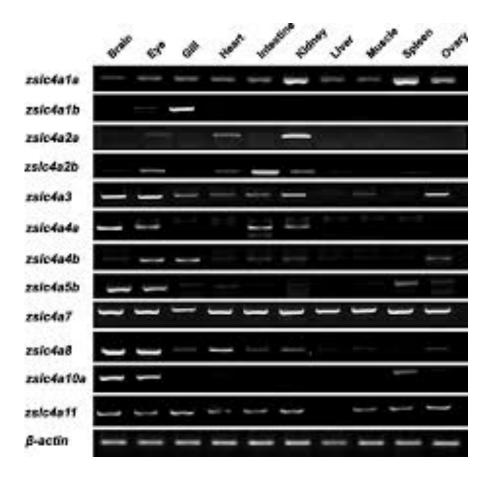
### RT-PCR fonti di RNasi

- Tamponi e soluzioni di uso comune: presenza di batteri o altri microrganismi che rilasciano i loro enzimi; autoclavarli NON inattiva le RNasi, anzi può introdurle nei reagenti
- lavorare senza guanti può introdurre nelle soluzioni RNasi batteriche e cellulari
- batteri veicolati dall'aria possono sedimentare sulla superficie delle soluzioni, portando con sè RNasi
- Pipette: Mai utilizzare le stesse pipette che hanno già dispensato soluzioni di RNasi

#### E' importante quindi

- Utilizzare plastica garantita RNasi-free Trattare la vetreria per almeno 4 ore a 200°C
- Indossare sempre guanti e cambiarli spesso
- Mantenere un'area di lavoro separata, dedicata all'RNA

# Utilizzo della PCR espressione genica RT-PCR



### Utilizzo della PCR

espressione genica RT-PCR

> RNA totale isolato da 106 cellule: kit "SV total RNA isolation system"

- > RNA totale isolato da 10<sup>6</sup> cellule: kit "SV total RNA isolation system" (Promega, Italia)
- > Reazione di retrotrascrizione: kit "Qiagen Omniscript RT" (Qiagen GmbH, Germania) usando 1,5 μg di RNA.
- > PCR: kit "Hot Start Taq Master mix (Qiagen GmbH Germania)
- Recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>dell'uomo:

### Primers CB<sub>1</sub>

5'-CCACTCCCGCAGCCTCCG-3' (senso) 5'-ATGAGGCAAAACGCCACCAC-3' (antisenso)

Prodotto 293 bp

#### **Primers CB<sub>2</sub>**

5'-CGCCGGAĀGCCCTCATAC-3' (senso) 5'-CCTCATTCGGGCCATTCTTG-3' (antisenso)

Prodotto 522 bp

GAPDH gene ad espressione costitutiva:

### **Primers**

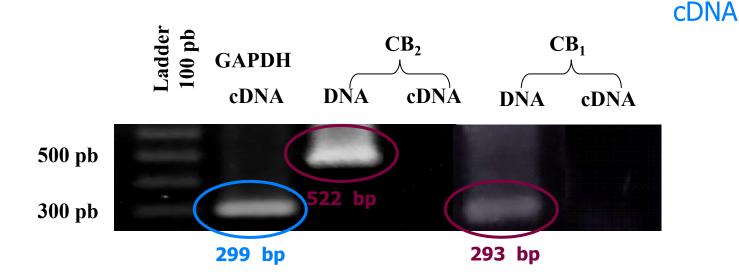
5'-GTGAAGGTCGGTGTCAACG-3' (senso) 5'-GGTGAAGACGCCAGTAGACTC-3' (antisenso)

Prodotto 299 bp

# Utilizzo della PCR espressione genica RT-PCR

### ESPRESSIONE DEI RECETTORI CB<sub>1</sub> E CB<sub>2</sub> TRAMITE RT-PCR

- ◆ bande attese dal DNA cellule HK-2 » validità protocollo
- ♠ banda attesa (299 bp) dalla RT-PCR per la GAPDH → Buona qualità



Non è stato ottenuto nessun prodotto di PCR specifico per i recettori CB<sub>1</sub>e CB<sub>2</sub> da RNA estratto dalle cellule HK-2