

GENOMA UMANO: CIRCA 35.000 GENI

OTTENERE MOLTE COPIE
DELLA STESSA SEQUENZA



CLONAGGIO

VETTORE: molecola di DNA che
permette l'amplificazione della
sequenza d'interesse

CARATTERISTICHE DI UN VETTORE DI CLONAGGIO

- Replicazione all'interno di un organismo ospite (amplificazione).
- Contengono regioni non essenziali che possono essere sostituite dalla sequenza di interesse.
- Contengono regioni che permettono l'inserimento di sequenze (polylinker).
- Marcatori genici (utili per la selezione).
- Possono essere facilmente estratti dalla cellula ospite.

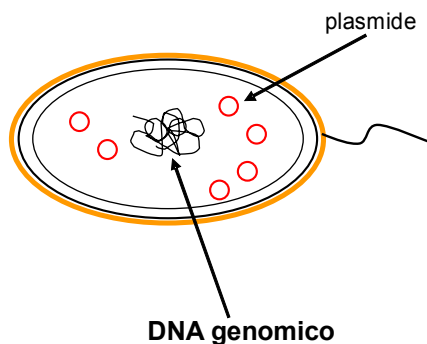
VETTORI DI CLONAGGIO

- **Plasmidi**
- **Cosmidi**
- **Fagi**
- **BAC** (bacterial artificial chromosome)
- **YAC** (yeast artificial chromosome)

VETTORI DI CLONAGGIO

Plasmide

Molecola di DNA circolare (nella maggior parte dei casi)
Potrebbe essere considerato una forma di vita indipendente (come i virus), poiché è capace di **replicazione autonoma** in un ambiente opportuno (ospite batterico).



Simbiosi (non parassitismo): conferisce particolari caratteristiche vantaggiose all'ospite come la **resistenza ad un antibiotico**. Nella maggior parte dei casi sono molecole circolari **superavvolte**.

REPLICAZIONE

Plasmidi di grandi dimensioni



coordinata al genoma batterico
controllo stringente



da una a poche copie
per cellula

Plasmidi di piccole dimensioni

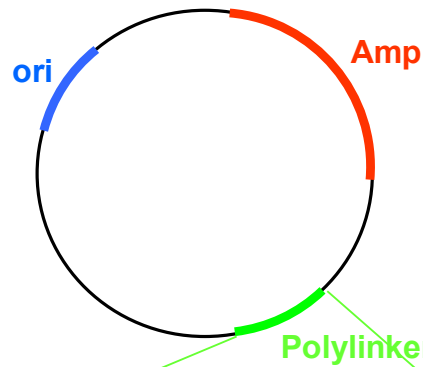


indipendente dal genoma batterico
controllo rilassato



molte copie per cellula (fino a 1000)

CARATTERISTICHE DEL PLASMIDE



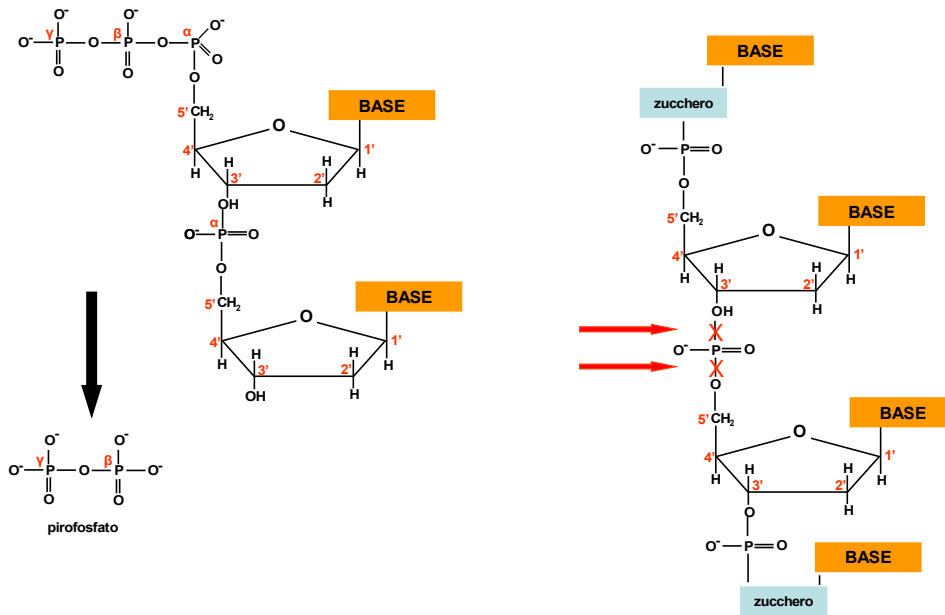
ori: origine di replicazione

Amp: gene per la β -lattamasi

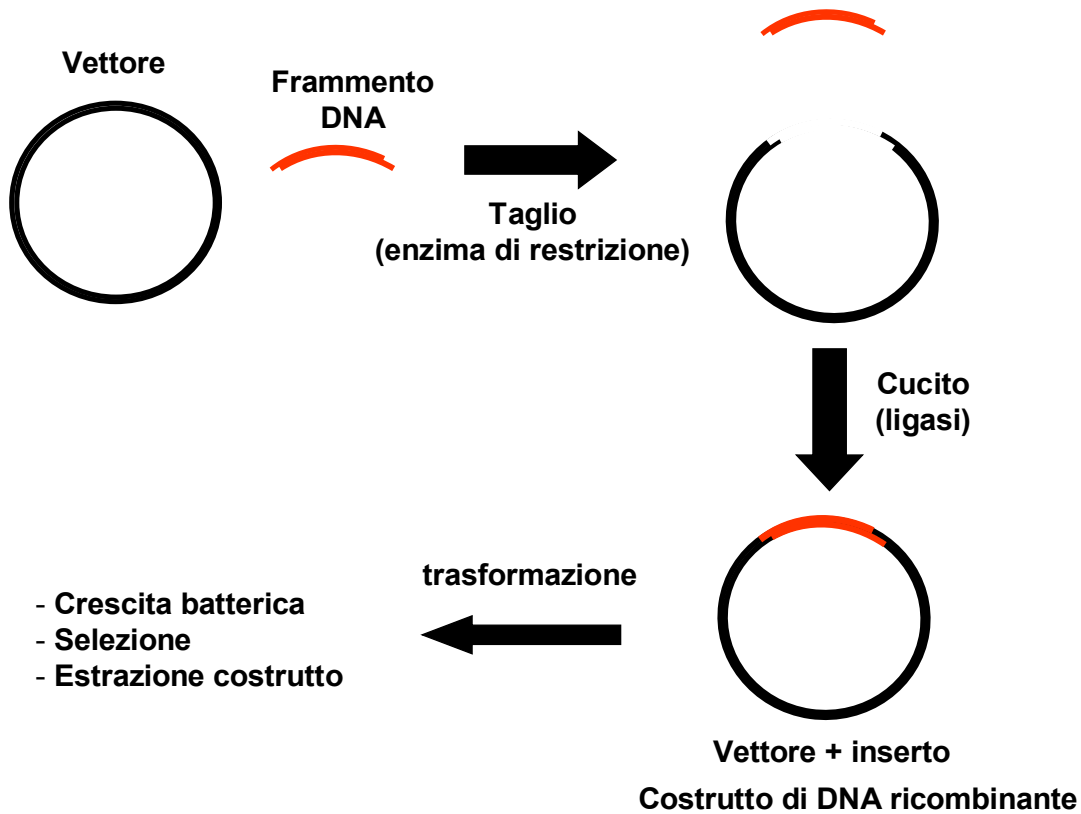
Polylinker: sito multiplo di clonaggio

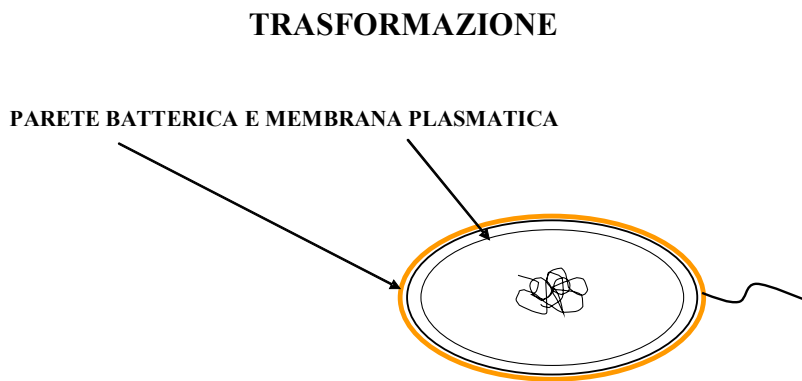
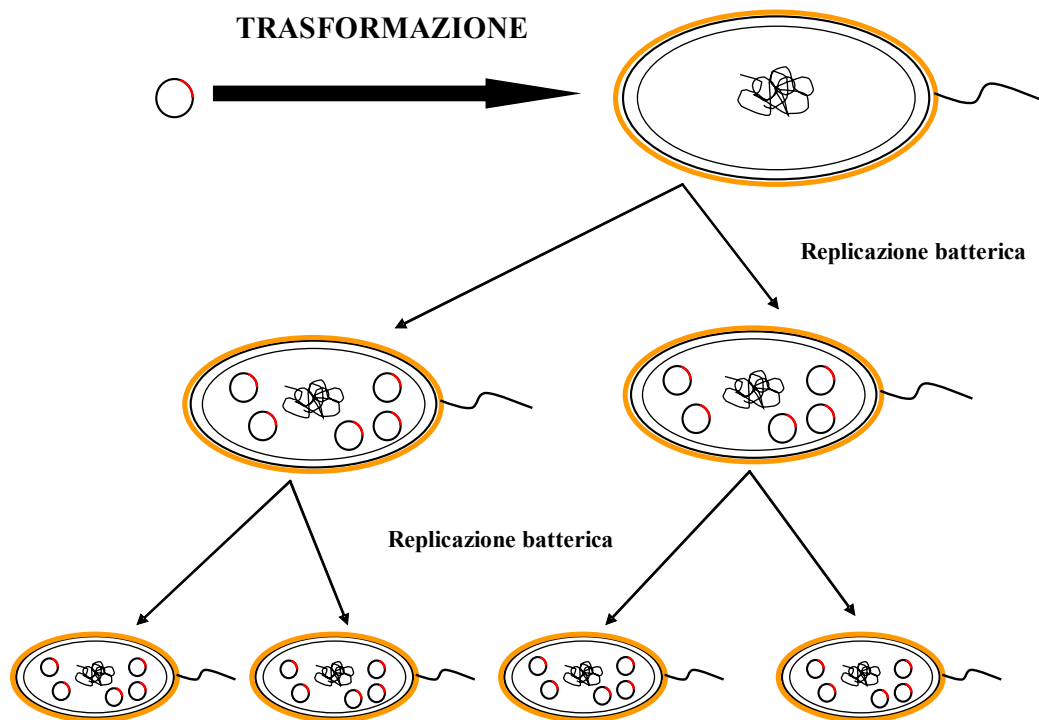
```
5' -CGATTATCACTAGTCTGAATTCAGCGGCCGCTCTGCAGGTCGAC-3'  
3' -GCTATTAGTGATCAGCTTAAAGTCGCCGGCGAGACGTCCAGCTG-5'
```

SpeI EcoRI NotI PstI



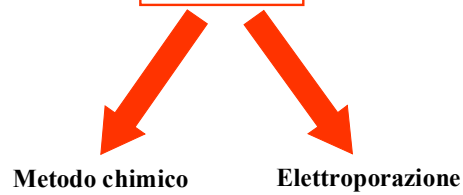
CLONAGGIO





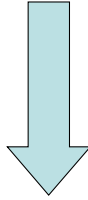
La parete batterica è porosa quindi non costituisce un vero ostacolo.

La membrana plasmatica deve essere permeabilizzata mediante la formazione di pori.



TRASFORMAZIONE BATTERICA CON CaCl_2

I batteri vengono preventivamente resi “competenti” mediante un trattamento con Cloruro di Calcio.



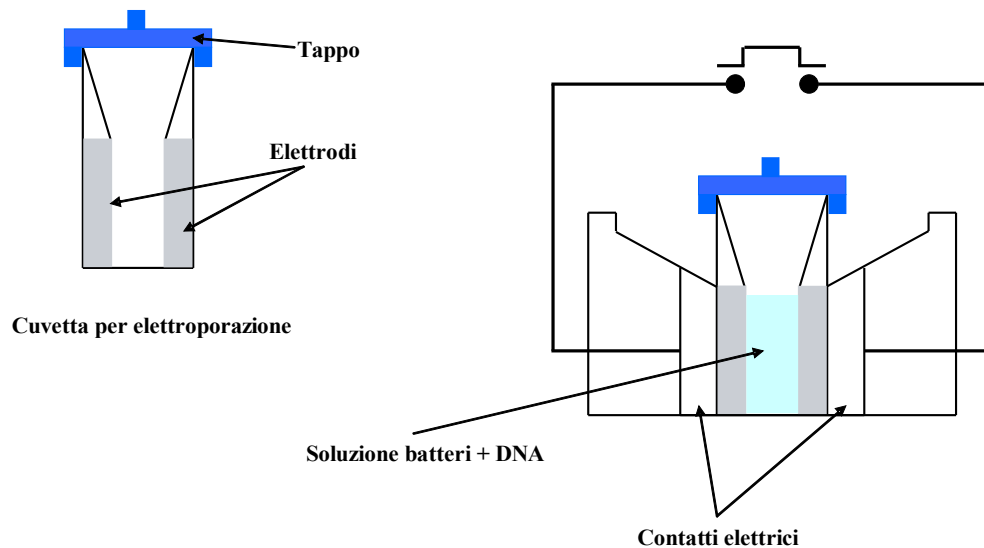
Si unisce il DNA ai batteri che vengono sottoposti ad uno shock termico

GHIACCIO \Rightarrow 42 °C \Rightarrow GHIACCIO

Incubazione in terreno di coltura a 37 °C per circa 1 ora senza antibiotico.

ELETTROPORAZIONE

Si creano pori transitori a livello della membrana plasmatica mediante l'applicazione di un campo elettrico

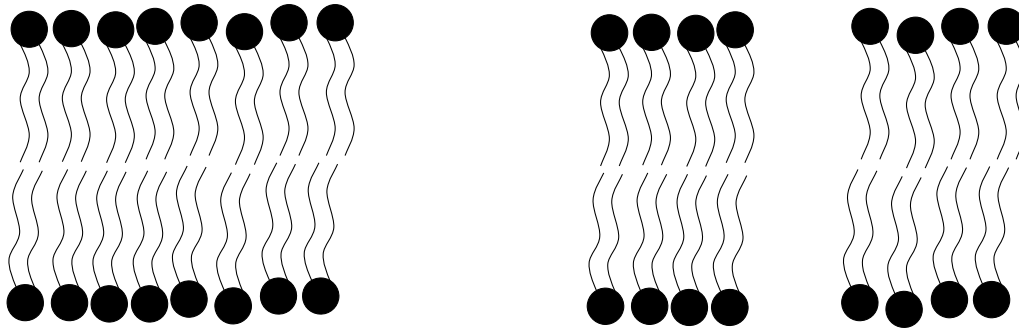


L'impulso elettrico porta ad un aumento considerevole del potenziale di membrana.

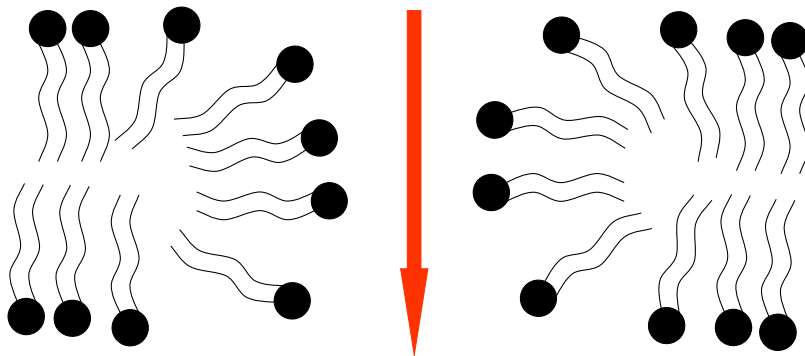
Riarrangiamento della struttura molecolare della membrana.

Formazione di pori che si riempiono di molecole di acqua (pori idrofilici).

Aumento del trasporto transmembrana di ioni e molecole.



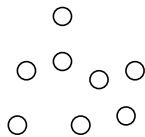
Pori idrofobici



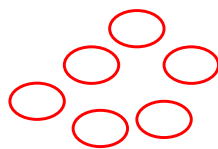
Pori idrofilici

SELEZIONE

Plasmide con gene β -lattamasi



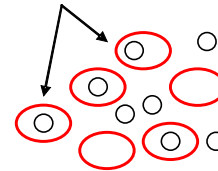
Batteri



trasformazione



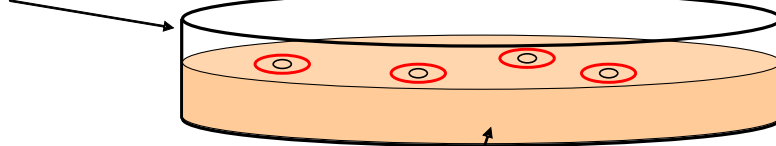
Batteri trasformati



Batteri non trasformati

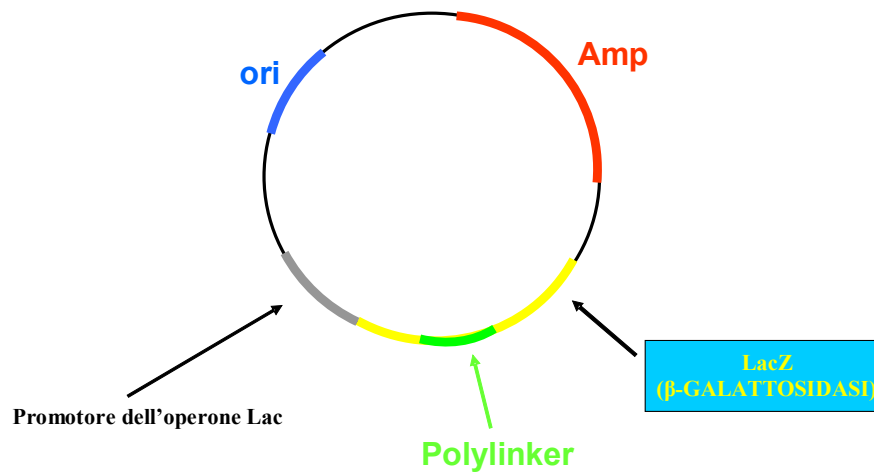
PIASTRATURA SU TERRENO SELETTIVO

Capsula o piastra di Petri



Terreno di coltura + antibiotico
(LB + ampicillina)

TEST DI α -COMPLEMENTAZIONE

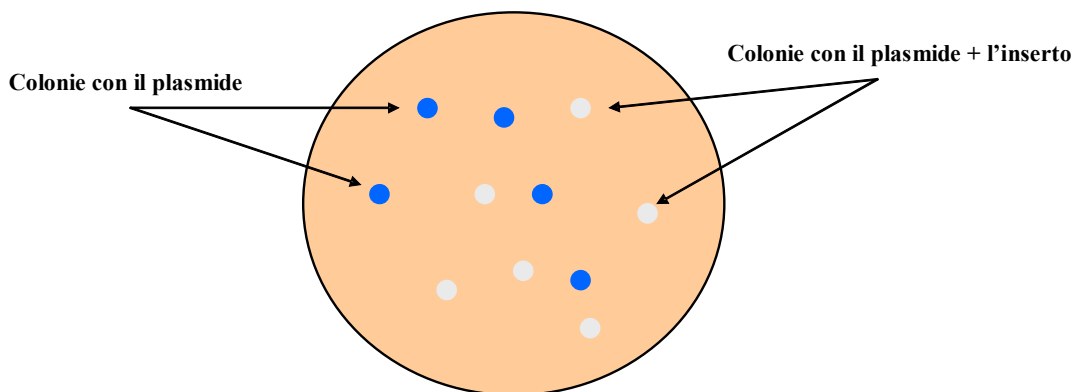


Nel terreno di coltura si aggiungono l'**IPTG** (isopropil- β -D-tiogalattopiranoside) e l'**X-Gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-Betagalattoside).

La presenza dell'induttore **IPTG** permette l'espressione del gene **LacZ**

Nelle colonie in cui si produce una **β -galattosidasi** funzionale il substrato **X-Gal** viene trasformato in un prodotto di colore **BLU**

Nelle colonie in cui è presente un plasmide con l'inserto il gene per la **β -galattosidasi** è interrotto (inattivazione inserzionale), quindi l'assenza di un'attività enzimatica funzionale non permette la trasformazione del substrato



EFFICIENZA DELLA TRASFORMAZIONE

Numero di colonie trasformate
µg di DNA

| | |
|---|---|
| TRASFORMAZIONE CHIMICA (CaCl ₂) | 5 x 10 ⁶ – 2 x 10 ⁷ |
| ELETTROPORAZIONE | 10 ⁹ |

La trasformazione chimica è sufficiente per clonaggi di routine, mentre l'elettroporazione, data la sua maggiore efficienza viene utilizzata per clonaggi più difficili o per la costruzione **genoteche**.

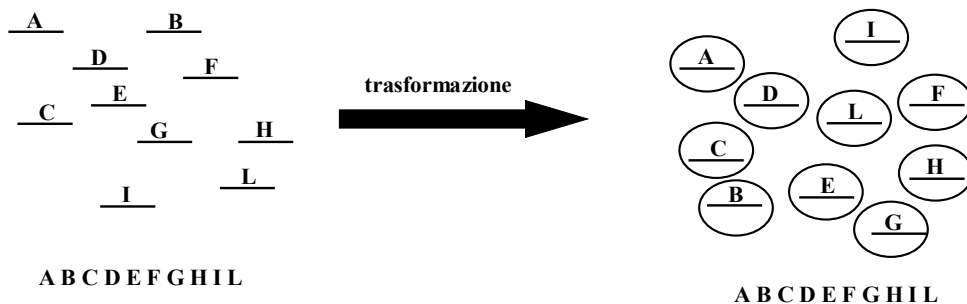
LIBRERIA GENOMICA 0 GENOTECA: collezione di tutti i frammenti genomici rappresentanti l'intero genoma di un organismo.

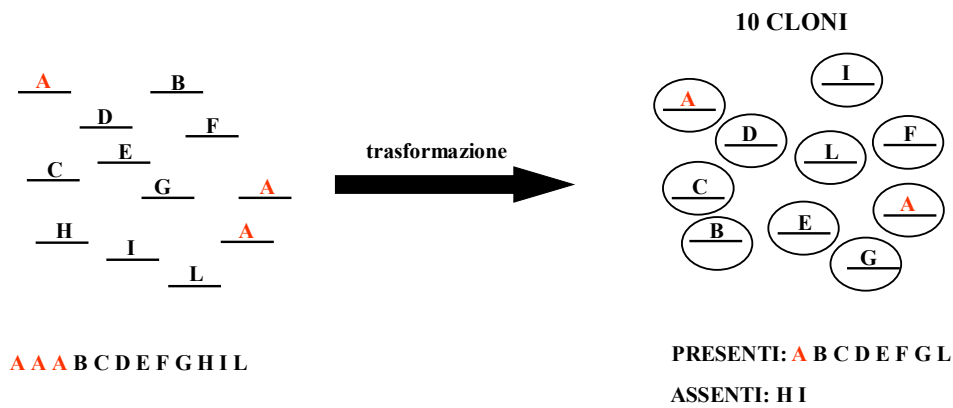
GENOTECA GENOMICA: collezione di frammenti genomici

cDNAteca: collezione di molecole di DNA copiate dagli RNA

RAPPRESENTATIVITA'

Una libreria rappresentativa contiene almeno una copia di tutte le possibili sequenze.





| | |
|------------|---------|
| - Plasmidi | 10 kb |
| - Cosmidi | 20 kb |
| - Fagi | 45 kb |
| - BAC | 100 kb |
| - YAC | 1000 kb |

RAPPRESENTATIVITA'

$$N = \frac{\ln (1-P)}{\ln (1-f)}$$

N: numeri di cloni necessari

P: probabilità desiderata

f: frazione del genoma mediamente contenuta in un clone

ESEMPIO

Per una probabilità del 99% che una sequenza sia rappresentata in una libreria dove ogni frammento Genomico è di circa 10 kb, devo avere un numero di cloni almeno pari a

$$N = \frac{\ln (1-0,99)}{\ln (1-10^4/3 \times 10^9)} = 1.400.000$$

