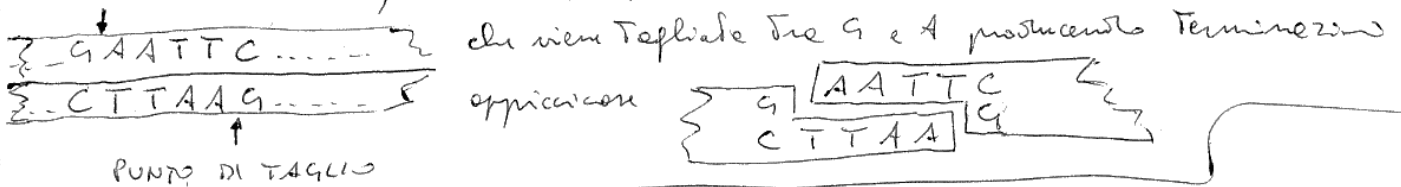


1) enzimi di restrizione

Sono enzimi che si sono evoluti in batteri che li utilizzano per difendersi dai virus. Riconoscono una sequenza di 5 o 6 paia di basi PALINDROMA e Tagliano il DNA o l'RNA, o ricano, o all'interno delle sequenze riconosciute. Per questo sono chiamati endonucleasi di restrizione. In ingegneria genetica si utilizzano quelle di tipo II che tagliano all'interno delle sequenze. Gli Tagli possono essere al centro delle sequenze e allora si producono Terminazioni Tronchi, o in punti simmetrici rispetto al centro e allora si producono Terminazioni appiccicose. Gli ECOR1 (enzime estratti da Escherichia Coli), per esempio, la sequenza palindroma riconosciuta è

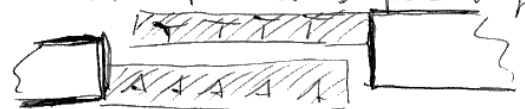


Le due catene ottenute con ECOR1 si possono legare attraverso le Terminazioni appiccicose e qualunque altro frammento di DNA Tagliato con ECOR1 solo se le Terminazioni sono sempre complementari.

Le catene vengono infine unite covalentemente

usando l'enzima DNA Ligasi. Il DNA ottenuto unendo frammenti di diverse provenienze è detto DNA ricombinante.

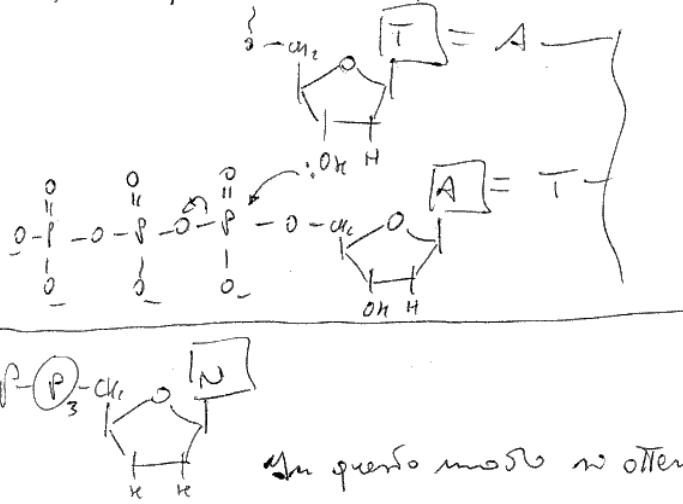
Se le Terminazioni sono invece Tronchi catene di diversa provenienza possono essere unite dopo aver creato una piccola catena extra poli A o poli T per creare l'appiccicatura tra i due filamenti.



oltre che per generare DNA ricombinante

gli enzimi di restrizione vengono utilizzati in molti altri ambiti. Per esempio per tagliare il DNA nell'analisi sul DNA su polizze, per tagliare il DNA per ottenere frammenti per la PCR, per le sequenziazioni, per la ricerca di mutazioni genetiche ecc.

2) Sequenziamento per Terminazione su catena,



Debo che l'allungamento di catena avviene con, per attacco dell'OH 3' sul Triphosfato in posizione 5' del nucleotide successivo, per Terminare la catena è necessaria la presenza di un nucleotide privo di OH nella posizione 2' e 3'

In questo modo si ottengono, nelle miscele di una nuova catena, frammenti che Terminano in corrispondenza di un nucleotide di blocco.

Se questi vengono marcati con atomi di Radioattivo, saranno riconoscibili in elettroforesi. Naturalmente si devono fare 4 esperimenti paralleli in ognuno dei quali si introduce un nucleotide di blocco diverso. La procedura è illustrata qui sotto. Sequenze da riconoscere: 3' GACCTAAGTTA 5'

oltre al DNA stampo servono: un primer 5' CT 3', la DNA polimerasi I, i 4 nucleotidi Triphosfati, e in ogni provetta uno dei 4 nucleotidi Triphosfati di blocco. Risultati saranno o il primer o il blocco. La sequenza sintetizzata insieme: CTGGATTCAAT

	dATP	dTTP	dGTP	dCTP
	GGG	GGAT	G	GGATTC
<u>CT</u>	GGATTCA	GGATT	GG	
	GGATTCAA	GGATTCAAT		

Sequenze Troncate
Le sequenze ottenute nei 4 diversi esperimenti vengono sottoposte ad analisi elettroforica

LUNGHEZZA	NUCLEOTIDI EXTRA				↓	3'
	A	T	G	C		
11		■			3	T
10	■				8	A
9	■				7	A
8				■	6	C
7		■			5	T
6		■			4	T
5	■				3	A
4			■		2	G
3			■		1	G
2				■		T
1						C

Sequenze lette sul gel di sequenza:
5' CTGGATTCAAT 3'
↓
3' GACCTAAGTTA 5'

Sequenza cercata