

## Esperienza 3: clonaggio di un gene in un plasmide

Il clonaggio molecolare è una delle basi dell'ingegneria genetica. Esso consiste nell'inserire un frammento di DNA (chiamato inserto) in un vettore appropriato come un plasmide per esempio (vedi esperienza 4 per una spiegazione sui plasmidi). Il nuovo plasmide creato sarà poi introdotto in una cellula ospite, in generale *E. coli*. Essa sarà allora selezionata e moltiplicata per ottenere una grande quantità di plasmidi d'interesse. Clonare un gene consiste dunque nell'inserirlo in un plasmide. Un clone sarà il trasformante batterico che contiene questo plasmide particolare. In questo caso si parla di clone perché tutti gli individui della colonia batterica sono geneticamente identici. Il clonaggio molecolare è dunque differente dal clonaggio riproduttivo (creare un individuo geneticamente identico a un altro ma con un'età diversa) o dal clonaggio terapeutico (fabbricare dei tessuti a partire dalle cellule staminali per eseguire degli innesti compatibili col ricevente).

**Soggetti:** clonaggio molecolare, vettori, ospiti, digestione, legazione, trasformazione batterica, X-gal.

Il clonaggio molecolare necessita di enzimi di restrizione capaci di tagliare il DNA (cfr. esperienza 2), e della ligasi capace di incollare i frammenti di DNA. La ligasi è stata isolata per la prima volta a partire da un batteriofago T4. Questo enzima è implicato nella riparazione e la replicazione del DNA. Esso può legare dei frammenti di DNA con estremità coesive compatibili. Se è presente in concentrazione elevata, questo enzima è anche capace di legare delle estremità piatte (cfr. esperienza 2) di DNA. La ligasi T4 funziona utilizzando ATP e  $Mg^{2+}$ . Essa possiede un optimum d'attività a 16°C, ma resta attiva anche a temperatura ambiente.

Il primo clonaggio fu realizzato nel 1972 da Paul Berg che condividerà il premio Nobel di chimica nel 1980 con Walter Gilbert e Frederick Sanger. Nel 1977 è stato clonato il primo gene umano (codante la somatostatina), permettendo ai batteri di produrre delle proteine umane. L'era dell'ingegneria genetica e delle biotecnologie stava dunque iniziando.

## L'esperienza

In questa esperienza, si utilizzeranno i plasmidi che hanno un marcatore di resistenza a diversi antibiotici. Il plasmide ricevente (pUC19) contiene il gene di resistenza per l'antibiotico ampicillina. Esso sarà linearizzato grazie all'enzima di restrizione *Bam*HI. Il plasmide donatore pHP45 porta un frammento contenente il gene che codifica per la resistenza al cloramfenicolo. Esso sarà tagliato in 2 parti dall'enzima di restrizione *Bam*HI liberando così il gene di resistenza al cloramfenicolo. Il vettore pUC19 linearizzato e il prodotto di digestione di pHP45 saranno poi mescolati. La ligasi permetterà la formazione di un nuovo plasmide contenente i due geni di resistenza per l'ampicillina e il cloramfenicolo. Dopo la trasformazione del prodotto della legazione in *E. coli*, solo i batteri che hanno incorporato il plasmide potranno crescere su un terreno di coltura contenente i due antibiotici. Questi batteri saranno dunque facilmente selezionati.

I frammenti da clonare non sono sempre così semplici da trovare. Questo perché molti vettori portano un piccolo pezzo di gene *lacZ* (che codifica la  $\beta$ -galattosidasi). Questo enzima trasforma il lattosio, un disaccaride, in due monosaccaridi, il galattosio e il glucosio. Questo enzima trasforma anche l'X-galattosio (X-gal) incolore in un prodotto blu insolubile che si accumula nelle cellule. Se un frammento di DNA è inserito nel gene *lacZ*, esso non sarà più funzionale e la conversione di X-gal non sarà più possibile. Le colonie resteranno dunque bianche. In assenza dell'inserito, il gene *lacZ* sarà funzionale e la colonia batterica diventerà blu. Questa selezione blu/bianco è un modo molto pratico di selezionare le colonie che contengono il plasmide con l'inserito.

## Protocollo

### 1) Digestione

I plasmidi pUC19 (carta di restrizione, cfr. esperienza 2) e pHP45-CmR sono tagliati con l'enzima di restrizione *Bam*HI (volumi in  $\mu$ l, totale 20  $\mu$ l):

- Numerare 2 tubi eppendorf.
- Aggiungere gli elementi come descritto nella tabella qui sotto (i volumi sono in  $\mu$ l).

	H2O	pUC19	pHP45-CmR	tampone di digestione 10x	<i>Bam</i> HI
eppendorf 1	13	4	-	2	1
eppendorf 2	9	-	8	2	1

**Attenzione: tenere gli enzimi di restrizione sul ghiaccio. Utilizzare una punta nuova ogni volta che si pipetta.**

- Mescolare pipettando 3-4 volte.
- Incubare la reazione a 37°C per 30-60 minuti.
- Mettere i tubi a 70°C per 15 minuti per inattivare gli enzimi di restrizione.

### 2) Legazione

- Prendere 2 nuovi tubi marcati L (legazione) e C (controllo).
- Aggiungere gli elementi come descritto nella tabella qui sotto.

	eppendorf 1	eppendorf 2	H2O	tampone di digestione 10x	DNA ligasi
eppendorf L	3	10	4	2	1
eppendorf C	3	10	5	2	-

**Attenzione: tenere gli enzimi di restrizione sul ghiaccio. Utilizzare una punta nuova ogni volta che si pipetta.**

- Lasciare i tubi 15-30 minuti a temperatura ambiente per permettere la legazione dei frammenti di DNA.

### 3) Trasformazione

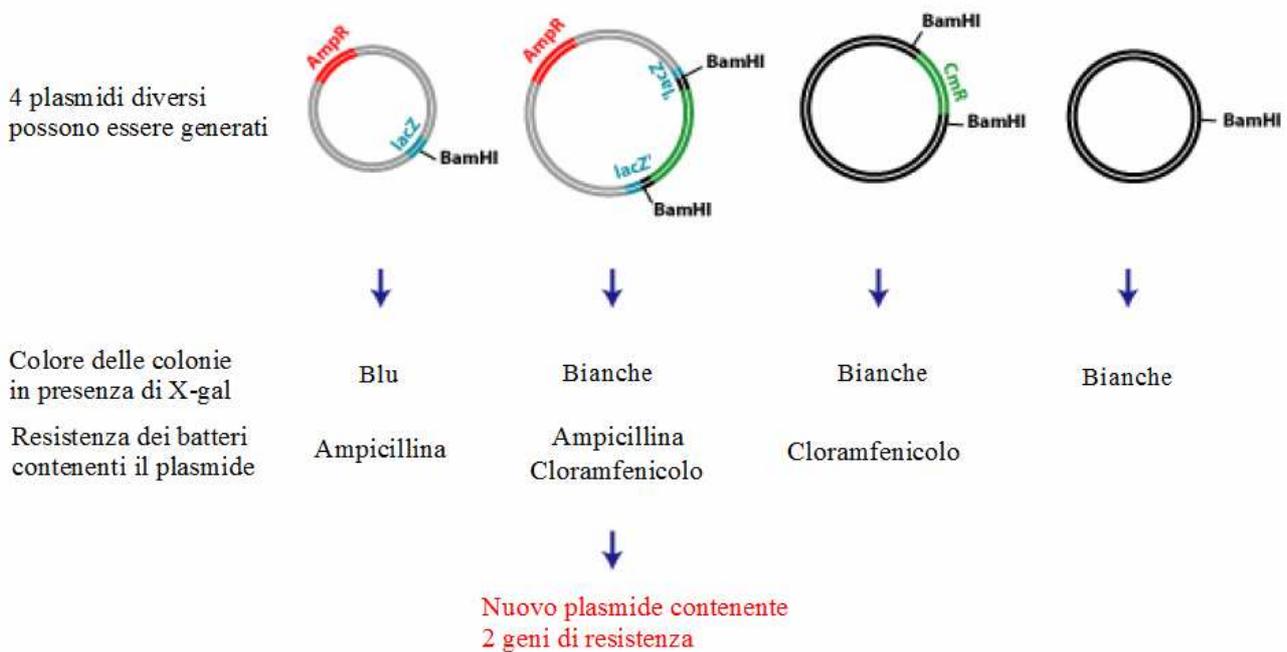
I batteri *E. coli* sono resi competenti come descritto nell'esperienza 4.

- Aggiungere 10  $\mu$ l del tubo L in 100  $\mu$ l di cellule competenti. Scrivere su questo tubo TL (trasformazione L).
- Aggiungere 10  $\mu$ l del tubo C in 100  $\mu$ l di cellule competenti. Scrivere su questo tubo TC (trasformazione C).
- Aggiungere 10  $\mu$ l di acqua in 100  $\mu$ l di cellule competenti (controllo negativo di trasformazione). Scrivere sul tubo T-.
  - Mettere i tubi 15 minuti sul ghiaccio.
  - Incubare i tubi 2 minuti a 42°C (choc termico).
  - Rimettere i tubi 5 minuti sul ghiaccio.
  - Aggiungere 1 ml di LB in ogni tubo e incubare la sospensione a 37°C per 15-30

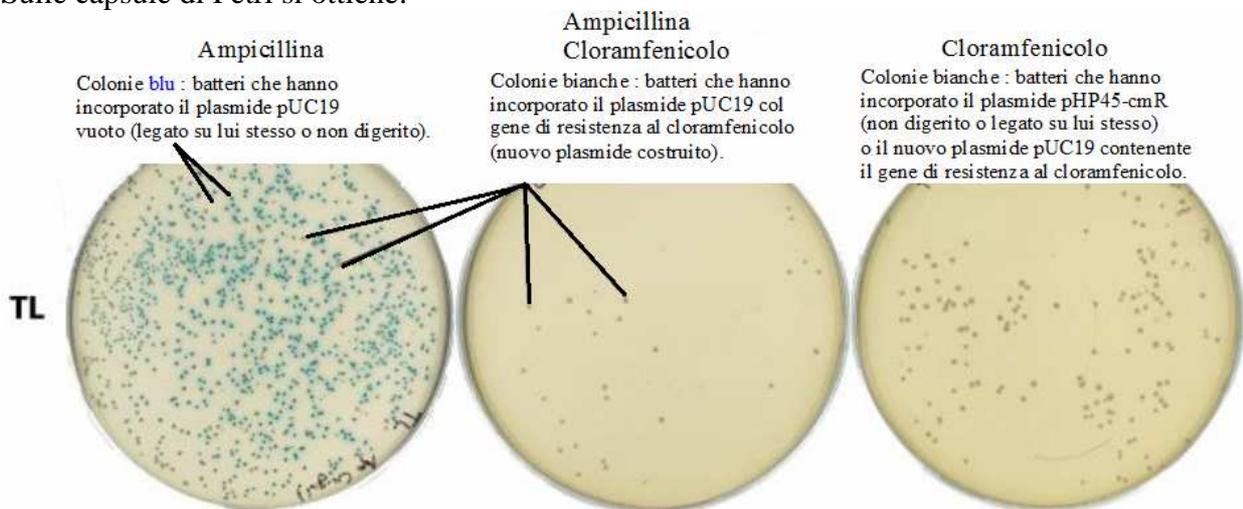
- minuti (per l'espressione della resistenza all'ampicillina).
- Prelevare da ogni tubo:
    - o 0.1 ml e seminare su una capsula di Petri LA + ampicillina + X-gal
    - o 0.1 ml e seminare su una capsula di Petri LA + ampicillina + cloramfenicolo + X-gal
    - o 0.1 ml e seminare su una capsula di Petri LA + cloramfenicolo + X-gal
  - Marcare la capsula di Petri sul fondo col vostro nome e il numero del tubo di trasformazione.
  - Incubare la capsula di Petri all'inghiù a 37°C per una notte. Le capsule di Petri possono poi essere tenute in frigo (4°C).

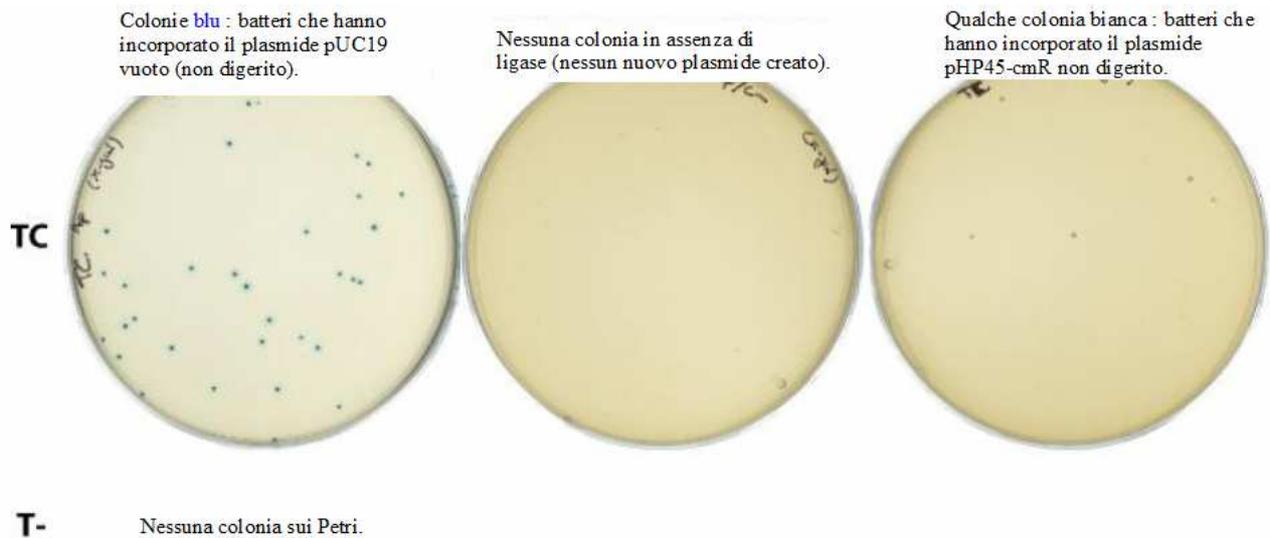
#### 4) Analisi dei risultati

Lo schema qui sotto mostra i 4 plasmidi che si possono ottenere e i risultati attesi sulle capsule di Petri.



Sulle capsule di Petri si ottiene:





## 5) Materiale

- P20, P200 e punte gialle
- Blocchi riscaldanti
- Tubi eppendorf sterili
- Acqua sterile
- Capsule di Petri LA-X-Gal: ampicillina, ampicillina + cloramfenicolo, cloramfenicolo
- DNA pUC19
- DNA pHP45-cmR
- Enzima di restrizione *Bam*HI
- Tampone di digestione (10x)
- DNA ligasi
- Tampone di legazione (10x)
- Cellule competenti *E. coli* (dh5 $\alpha$ )
- Blocco refrigerante per gli enzimi
- Etanolo e spatola per seminare